

**OBJECTIU**

## OBJECTIU

### Identificar gens involucrats en el desenvolupament prenatal de la Rata

Per tal d'assolir aquest objectiu:

- Aplicarem una tècnica d'anàlisi d'expressió gènica diferencial, com és la RAP-PCR, a fragments de tub digestiu microdissecats en fetus de rata.
- Caracteritzarem les seqüències que apareguin diferencialment representades, en relació a la localització o al grau de desenvolupament
- Es farà un estudi de localització morfològica de l'expressió gènica mitjançant la tècnica d'hibridació "in situ"

**MATERIAL I MÈTODES**

## 1. Obtenció del material fetal

### 1.1 Espècie i soca estudiada

Els animals d'experimentació utilitzats varen ésser rates (*Rattus Norvergicus*) de la soca OFA (línia Sprague-Dawley) procedents de l'Estabulari de la UAB.

Els animals varen ser estabulats en una zona de temperatura controlada a  $21^{\circ}\text{C} \pm 1$ , amb una humitat relativa de 40-70% amb un ritme de 12 h de llum (8-20 h) / 12 h de foscor (20 h-8 h) amb 10-15 renovacions d'aire/hora. Els animals estaven en caixes Standard de rosegador de 1000 cm<sup>2</sup> en un número de 2-3 animals per caixa. La dieta administrada era la A04 i el material absorbent era ULTRASORB. L'aigua era de la xarxa i posteriorment filtrada i tant l'aliment com l'aigua eren subministrats "ad líbitum".

### 1.2. Procediments realitzats amb rates gestants

#### 1.2.1. Selecció de femelles, acoblament, gestació

Abans de l'acoblament es realitzava un control de la impedància vaginal (per saber si l'animal estava en fase d'estre) a fi d'augmentar el percentatge de gestacions. L'acoblament entre el mascle i la femella (1 mascle amb 1 o 2 femelles per gàbia) es realitzava durant un període curt de temps: entre les 9 i les 11 del matí (durant les primeres hores del cicle de llum), per tal de conèixer amb major precisió l'edat gestacional. Posteriorment es realitzava un "control d'acoblament" mitjançant l'observació del "tap vaginal" i, en cas que aquest fos negatiu, es realitzava un frotis vaginal, amb microscòpia òptica i sense tinció, per a detectar la presència d'espermatozous del mascle. El rendiment, pel que fa al número de rates gestants, era inferior respecte al mètode "Standard" emprat en l'animalari del nostre centre (acoblament de 8 de la nit a les 8 del matí) si bé el fet de poder precisar més l'edat exacte de gestació ens compensà amb escriure aquest dèficit.

Tot el procés de manipulació dels animals va ésser aprovat pel Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya, amb l'informe previ de la Comissió d'ètica de la UAB.

### 1.2.2. Eutanàsia

Quan s'assolia el període de desenvolupament desitjat, les rates gestants eren sacrificades per sobredosi de CO<sub>2</sub>, administrada per inhalació, a l'interior d'una cambra hermètica a on s'introduïa la gàbia.

### 1.2.3. Laparotomia, histerectomia i obtenció de mostres maternes

Després de la confirmació de la mort de la femella gestant aquesta era traslladada immediatament a la "zona quirúrgica" on es procedia a practicar una laparotomia mitjana, ampliada amb sengles incisions subcostals. A continuació, es practicava l'extracció dels corns uterins, el quals eren separats de l'oviducte corresponent, del coll uterí i del mesometri mitjançant dissecció i les oportunes seccions.

Del cadàver de la mare s'obtenien mostres d'alguns òrgans per a l'obtenció de teixits control i la resta era retornat a l'estabulari per a ser incinerat.

## 1.3. Procediments realitzats amb els fetus

### 1.3.1. Extracció dels fetus

Els corns uterins s'introduïen a dins d'un recipient amb una solució estèril de *Tirode sense calci al 10%* a on es rentaven, mitjançant una suau agitació. Posteriorment es separaven cadascuna de les dilatacions uterines i es dipositaven en un recipient amb *Tirode sense calci al 10%*, rodejat de gel, dins una cambra termoaïllada, i s'extreïen les membranes embrió just abans de realitzar el procés de microdissecció.

### 1.3.2. Obtenció de mostres fetals. Tècnica de microdissecció. Conservació.

Dessota d'una lupa de microdissecció es col·locaven els fetus, sense presència de signes vitals, i es subjectaven amb agulles d'entomologia sobre un suport de suro. Posteriorment es practicava una laparotomia mitjana, ampliada amb dues incisions subcostals, perllongades fins les crestes ilíiaques, per accedir a l'interior de la cavitat peritoneal. Tot seguit es procedia a la segmentació de l'intestí abdominal, d'acord amb uns criteris embriològics i/o anatòmics. La sistemàtica seguida, va ésser, generalment, la que tot seguit descriuré: en primer lloc, es localitzava el cec i la unió ileocecal, es separava l'ili del cec i a partir de l'ili terminal s'anava separant tot l'ili i el jejú del mesenteri, fins arribar a l'angle duodenojejunal, on es seccionava. Des del cec es procedia a dissecar el còlon fins al

punt a on es forma un angle agut (angle còlic), lloc on es seccionava. D'aquesta manera quedava, distalment, la resta de l'intestí gros que era dissecat fins al punt on travessa el diafragma pelvià, a on es seccionava. Aixecant el fetge, amb una microespàtula, es dissecava l'estómac, es separava dels seus mesenteris, per tant dels òrgans veïns com el fetge i la melsa i, amb una secció al càrdies, es separava de l'esòfag abdominal. Distalment, es seccionava el pílor i es separava del duodè. El pàncrees era separat del marc duodenal, el qual ja havia estat aïllat dels segments intestinals que el precedeixen (estómac) i el que el continua (jejú).

Amb el procés de la microdissecció s'obtenien segments de tub digestiu que s'agrupaven de la següent manera:

#### Derivats de l'intestí anterior

- **Estómac (E)**: tot l'estómac.
- **Duodè anterior (Da)**: segment proximal del duodè.

#### Derivats de l'intestí intermedi o mitjà

- **Duodè mitjà (Dm)**: segment de la part més distal del duodè.
- **Budell Prim proximal (Bpp)**: segment de la meitat proximal del budell prim no duodenal
- **Budell Prim distal (Bpd)**: segment de la part distal del budell prim.
- **Còlon mitjà (Cm)**: cec i la nansa intestinal que el segueix distalment, fins "l'angle còlic".

#### Derivats de l'intestí posterior

- **Còlon Posterior (Cp)**: la part del còlon distal a l'angle còlic i el recte proximal al diafragma pelvià.

Un cop extretes les mostres eren dipositades a l'interior d'ependorfs, que eren submergits en Nitrogen líquid i conservats en un congelador a -80°C.

### 1.3.4. Tractament dels fetus per a la HIS

Per a la realització de la tècnica de la Hibridació in situ es va requerir la fixació per perfusió dels fetus amb paraformaldehid al 4% en PBS. Posteriorment, els fetus eren postfixats amb el mateix fixador a 4°C, a continuació eren criopreservats amb paraformaldehid al 4% amb un 30% de sacarosa i, seguidament, congelats i emmagatzemats a -80°C.

## 2. Extracció del RNA

L'extracció d'RNA es va realitzar seguint el mètode d'extracció amb tiocianat de guanidini i fenol-cloroform (Chomczynski & Sacchi, 1987) que es detalla tot seguit:

### 1<sup>r</sup> dia:

1. Les mostres eren lisades, en una placa de Petri petita situada sobre una placa freda, amb una quantitat variable de solució D (4MTiocianat de Guanidina, 25mM citrat sòdic, 0,5% sarcosil, 0,1M  $\beta$ -mercaptoetanol) que oscil·lava entre 100-2000  $\mu$ l, depenent de la grandària del teixit a lisar.
2. El lisat es transferia a un eppendorf on s'hi afegeixen seqüencialment:
  - 0,1 volums d'Acetat sòdic 2M pH 4
  - 1 volum de Fenol saturat amb H<sub>2</sub>O pH 4(Amresco)
  - 0,2 volums de Cloroform: alcohol isoamílic (49:1) (Merck)Després d'afegir cadascun es barrejava per inversió.
3. Vòrtex de 10"
4. 15' en gel, o bé fins que es separessin dues fases
5. Centrifugar 15' a 14.000 rpm a 4° C
6. Recuperar la fase aquosa (que és la que conté el RNA; la fase fenòlica i la interfase contenen el DNA i les proteïnes)
7. Afegir 1 volum d'Isopropanol fred
8. Precipitar OVN a -20° C

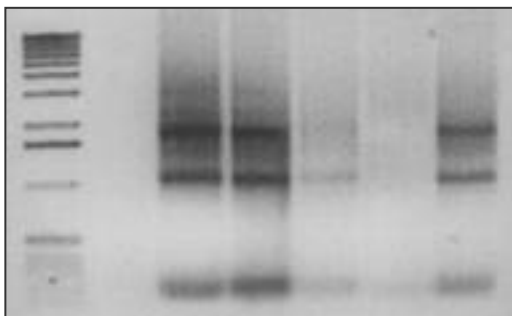
### 2<sup>n</sup> dia:

9. Centrifugar 15' a 14.000 rpm
10. Decantar i resuspendre el *pellet* amb 1/3 volum de Solució D + 2 volums d'Etanol absolut fred
11. Precipitar OVN a -20° C

### 3<sup>r</sup> dia:

12. Centrifugar a 14.000 rpm durant 20' a 4°C
13. Rentar el pellet amb 1 volum d'Etanol de 70° Fred
14. Centrifugar a 14.000 rpm durant 15'
15. Decantar el líquid i deixar assecar el *pellet* en gel

L'avaluació de la quantitat i la qualitat del RNA es feia mitjançant lectura a l'espectrofotòmetre i comprovació en un gel d'Agarosa al 1% i tenyit amb bromur d'etidi.



**Figura 10.** Comprovació de la qualitat del RNA amb un gel d'Agarosa al 1% tenyit amb Bromur d'Etidi

El RNA era emmagatzemat a -80°C

### 3. RT-PCR

**Nota:** Per la RAP-PCR s'ha utilitzat el primer D4S2912-GT  
(TCTAGTTAATTCTCCGTTTCAT)

#### 3.1. Retrotranscripció (RT)

L'RNA era *retrotranscrit* a cDNA mitjançant la següent reacció:

0,4µl H<sub>2</sub>O  
 4 µl Tampó de RT 5x  
 2µl dNTP's 5mM  
 2µl DTT 100mM  
 0,1 µl de *Primer* 100µM  
 0,5 µl d'Inhibidor d'RNAases 40u/µl (Amersham Pharmacia Biotech)  
 1µl Transcriptasa reversa M-MLV 200u/µl (Gibco, BRL)

Al volum total de la mescla (10 µl) s'afegien 10µl d'RNA (125 ng totals, 10 µl a una concentració de 12,5ng/µl)

Les reaccions s'incubaven durant 1 hora a 37°C i per finalitzar s'inactivava l'enzim portant la reacció a 95°C durant 5 minuts. En finalitzar la reacció els tubs es centrifugaven i es desaven a -80°C fins que es realitzava la PCR.

#### 3.2. PCR

La PCR es realitzava amb el mateix *primer* que la RT a partir de la següent mescla:

17 µl d'H<sub>2</sub>O  
 2,5µl de Tampó de PCR 10x  
 2,5µl dNTP's 1mM  
 0,25 µl de MgCl<sub>2</sub> 100mM  
 0,5µl de *Primer* 100µM  
 0,25 Taq DNA Polimerasa 5u/µl (Roche)

Al volum total de la mescla (23 µl) s'afegien 2µl de cDNA

Algunes PCR es realitzaven marcant el producte de PCR amb <sup>33</sup>P mitjançant la incorporació en la mescla de reacció de 2µCi de [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATP (Amersham Pharmacia Biotech) per mostra. Un cop preparats, els tubs s'introdueixen en el *termociclador* i se sotmetien al següent programa de cicles:

95°C 1'	
94°C 1'	5 cicles
50°C 45"	
72°C 1'15"	
94°C 1'	35 cicles
60°C 45"	
72°C 1'15"	
72°C 5'	



### 3.3. Electroforesi dels productes de PCR

#### 3.3.1. Característiques de l'electroforesi

Els productes de PCR es varen sotmetre a electroforesi en gels de seqüenciació (poliacrilamida al 6% i 8M d'Urea: 9 ml d'Acrilamida-bisacrilamida 40%(Gibco,BRL), 51 ml de TBE-Urea, 600 µl d'AMPS i 25 µl de TEMED). Per a tal fi es realitzava una dilució 1:4 de producte de PCR en tampó DLB, es desnaturalitzaven durant 3 minuts a 95°C i eren col·locats immediatament en gel. 3 µl eren carregats a cada pou i se sotmetien a una electroforesi a un voltatge de 55 w durant 4,5 hores.

#### 3.3.2 Autoradiografia

Els gels que contenien productes de PCR marcats amb  $^{33}\text{P}$  eren assecats a una temperatura de 60-80°C, durant 1-2 hores "al buit" i posteriorment exposats a una placa radiogràfica durant un temps variable en un cassette.

#### 3.3.3.Tinció de Plata

Els gels que contenien els productes de PCR que no havien estat marcats amb  $^{33}\text{P}$  es revelaven amb la tècnica de tinció de plata.

Breument, una vegada tret el gel de la cubeta d'electroforesi, s'extreia el vidre, al qual no havia quedat enganxat el gel d'acrilamida, i es dipositava en una cubeta de plàstic a on es submergia en les següents solucions:

1. Etanol 10% 10'
2. Àcid Nítric 3'
3. Rentat amb  $\text{H}_2\text{O}$  x2
4. 20' Nitrat de Plata
5. Rentat amb  $\text{H}_2\text{O}$
6. Carbonat Sòdic (29,6 gr de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 540µl de Formaldehid en 1 litre  $\text{H}_2\text{O}$ ). Controlant el revelat de les bandes.
7. Àcid Acètic 10% 5-10'
8. Rentat amb  $\text{H}_2\text{O}$

### 3.4. Anàlisi dels resultats. Retall i elució de bandes

#### 3.4.1. Anàlisi dels gels d'acrilamida

Per a poder estudiar globalment els resultats es varen realitzar gels que continguessin mostres de totes les localitzacions i de les diferents edats i es va decidir aïllar totes les bandes obtingudes per tal de conservar la possibilitat d'amplificar i clonar qualsevol dels productes de PCR si en un determinat moment ens interessava.

#### 3.4.2. Retall de les bandes del gel d'acrilamida. Elució.

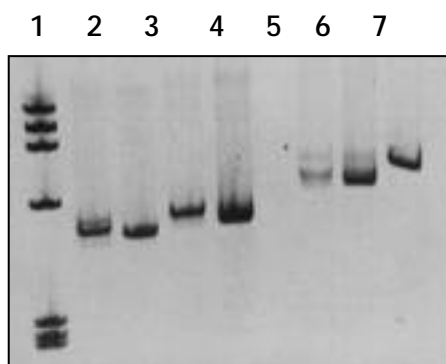
Les bandes eren retallades del gel i introduïdes en un eppendorf que contenia aigua estèril i s'incubava durant 2 hores a 60°C a fi d'eluir el DNA dins l'aigua.

Posteriorment a retallar les bandes, els gels eren novament exposats per a comprovar que el retall de la banda fos el correcte.

## 4. Clonació de les bandes. Seqüenciació.

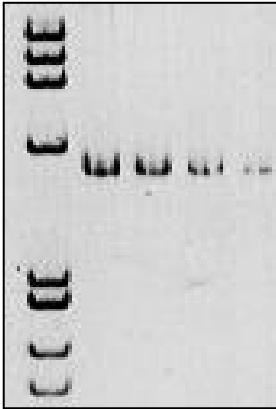
### 4.1. Amplificació de les bandes

Abans de començar el procés de clonació es realitzava una PCR d'alta astringència per comprovar la qualitat del DNA de la banda eluïda. En ocasions, l'amplificació de poca quantitat de DNA o la presència d'una banda mal definida en els gels d'acrilamida ens varen fer desestimar algunes de les bandes (Figura 11).



**Figura 11.** Gel d'Acrilamida per avaluar la qualitat del cDNA amplificat per fer la lligació. El primer carril conté el marcador HaeIII. El carril 2 presenta un *desdoblament* de la banda. El carril 5 no té DNA i el 6 en té poca quantitat

Just abans de fer el lligatge de les bandes amb el plasmidi (pCR® 2.1), els productes de la PCR es sotmetien a una electroforesi en un gel de poliacrilamida al 6% per tal de comprovar la mida, qualitat i quantitat de DNA amplificat per comparació amb el marcador  $\Phi$ XHae III (Fermentas) carregat en el mateix gel (Figura 12).



**Figura 12.** Gel d'Acrilamida al 6% previ al lligatge. Fet per calcular la grandària de la banda i la quantitat de DNA

#### 4.2.Lligatge

El lligatge del DNA amplificat amb el plasmidi (pCR® 2.1) es realitzava seguint el protocol i amb els reactius subministrats amb el kit de TA Cloning (Invitrogen). Breument ho resumiríem en les següents passes:

Per a calcular la quantitat de producte de PCR que havíem de posar a la reacció de lligatge utilitzàvem la següent fórmula:

$$x \text{ ng de producte de PCR} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ pb del producte de PCR}) \times (50 \text{ ng pCR}^\circ 2.1)}{\text{n}^\circ \text{ pb del vector (pCR}^\circ 2.1) = 3900}$$

La mescla de lligatge es realitzava seguint les següents proporcions:

Producte de PCR fresc	x $\mu$ l
Tampó de lligatge 10x	1 $\mu$ l
pCR® 2.1(vector)	2 $\mu$ l
Aigua estèril	Fins un volum de 9 $\mu$ l
-----	
T4 DNA lligasa	1 $\mu$ l
-----	-----
VOLUM TOTAL	10 $\mu$ L

La reacció s'incubava a 14°C durant 16 hores. A continuació es guardava a 4°C si s'havia d'utilitzar immediatament o congelava a -20°C si la transformació s'havia de diferir.

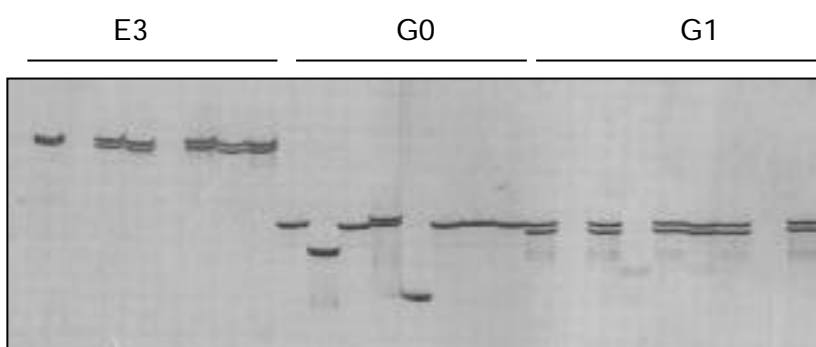
#### 4.3. Transformació. Creixement de colònies i selecció de clons

Per a la transformació es seguia el protocol del "Current Protocols":

1. S'agafaven 10 ng de DNA del producte de lligatge (Considerant com a DNA total la suma del DNA del plasmidi i el del producte de la PCR) en un volum final de 10-25 µl dins un eppendorf de 1,5 ml i es dipositava en gel.
2. S'afegeixen 100 µl de cèl·lules competents (*E. Coli*, soca To F-10), descongelades al moment mitjançant la fricció manual i es dipositava 10 minuts en gel.
3. Es sotmetia la barreja de les cèl·lules competents i el DNA a un xoc tèrmic mitjançant la col·locació dels tubs en un bany a 42°C durant 2 minuts.
4. S'afegia 1 ml d'LB i es dipositaven els tubs en un agitador a 200-250 rpm a una temperatura de 37°C.
5. Es sembrava una quantitat variable de cultiu de transformació en plaques d'LB-Agar amb ampicil·lina (50mg/ml) les quals s'havien "sembrat" 1 hora abans amb 32 µl d'X-GAL 50 mg/ml (Promega) i 40 µl d'IPTG 100mM (Sigma).
6. Les plaques es dipositaven en una estufa a 37 °C durant un temps que oscil·lava entre 14 i 16 hores.
7. Passat el temps de creixement bacterià (14-16 hores), les plaques es deixaven a 4°C durant 1-2 hores, per a revelar completament l'expressió del X-GAL, i poder diferenciar correctament les colònies que posseïen l'insert (color blanc) de les que no el posseïen (color blau)
8. Amb una nansa metàl·lica esterilitzada a la flama o amb una punta de pipeta estèril es "picaven" les colònies seleccionades i es posaven a créixer en un tub de 1,5 ml amb una quantitat d'LB-Ampicil·lina durant un temps variable (4-6 hores) en un agitador a 37°C

#### 4.4. Anàlisi dels clons seleccionats

1. S'agafen 200 µl d'LB-Ampicil·lina de cada clon
2. Centrifugar 5' a 13.000 rpm
3. Decantar i resuspendre en 200 µl de H<sub>2</sub>O estèril
4. Posar els tubs en un bany amb ebullició durant 5'
5. Centrifugar 5' a 13.000 rpm
6. Agafar el sobrenadant en un eppendorf
7. Realitzar una PCR amb el *primer* de la RAP-PCR (D4S 2912 GT)
8. Fer una electroforesi en un gel d'acrilamida, desnaturalitzant o no, dels productes de les PCR dels diferents clons, juntament amb la banda original amplificada, per a veure quins d'ells tenien l'insert de la longitud adequada.



**Figura 13.** Gel d'acrilamida desnaturalitzant per comprovar les característiques dels clons i comparar-los amb la banda original. En aquesta imatge veiem tres bandes (E3, G0, G1). En aquest cas, la banda del mig, (G0), mostra un major número de clons que no corresponen a la banda *original*.

#### 4.5. Seqüenciació

D'entre tots els clons s'escollien entre 1 i 3 per a seqüenciar en el seqüenciador automàtic. Per a la seqüenciació es procedia de la següent manera:

1. Es realitzava una PCR amb un volum final de 50µl amb un dels *primers* de seqüència continguda en el vector a banda i banda de l'insert: CR-II (forward o reverse) o M-13 (forward o reverse).

CR II forward GGCCGCCAGTGTGATGGATA

CR II reverse TCCACTAGTAACGGCCGCCA

M-13 forward (-20) GACCGGCAGCAAATG

M-13 reverse CAGGAAACAGCTATGAC

La mescla per a la primera PCR de seqüenciació era la següent:

H <sub>2</sub> O	33,8 µl
Tampó	5,4 µl
NTP's	5,4 µl
<i>Primer F</i>	1 µl
<i>Primer R</i>	1 µl
Taq	0,4 µl

i es realitzava en les següents condicions:

95°C 1'	
94°C 1'	20 cicles;
68°C 45"	
72°C 1'15"	
72°C 5'	

Els productes resultants eren purificats en un Kit GIBCO i analitzats en un gel d'electroforesi d'acrilamida al 9%. Segons els resultats del gels decidíem finalment els clons a seqüenciar i la quantitat de producte necessària per la reacció de seqüenciació.

Seguidament fèiem la reacció de seqüenciació segons la següent mescla :

DNA 1-3 µl (segons el gel preseqüenciació)

*Primer* 3,2 pmol/µl 1µl

cycling Mix 2µl

H<sub>2</sub>O Fins a 10µl

El programa de cicles que se seguia era el següent:

96°C 30"	25 cicles
55°C 15"	
60°C 4'	

A continuació es precipitava el producte de la reacció de seqüenciació seguint el següent protocol:

1. Afegir 20µl de MgCl<sub>2</sub> i 50 µl d'Etanol 95%
2. Deixar 15 ' a temperatura ambient
3. Centrifugar 15' a 14.000 rpm
4. Treure el *sobrenadant*
5. Afegir 50µl d'Etanol de 70% x3
6. Centrifugar 5' a 14.000 rpm
7. Treure el *sobrenadant*
8. Repetir 2 vegades els passos 5-7
9. Eliminar l'Etanol al màxim i deixar-ho assecar a l'aire
10. Congelar a -20°C fins a enviar-ho per la seqüenciació automàtica

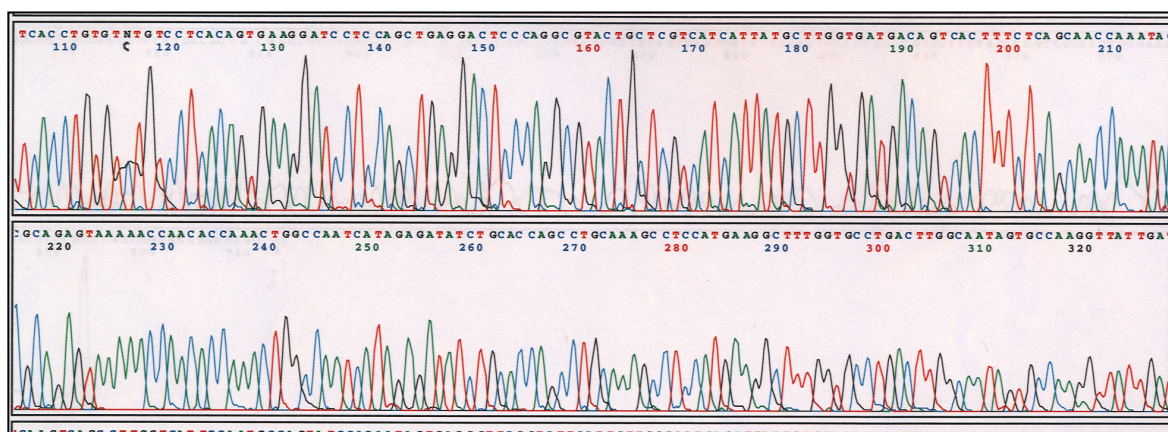


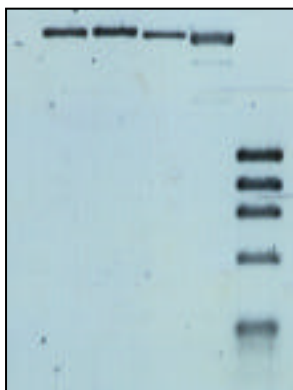
Figura 14. Fragment de la seqüència automàtica de la banda F8

## 5. Hibridació in situ

### 5.1. Preparació de les sondes per la HIS

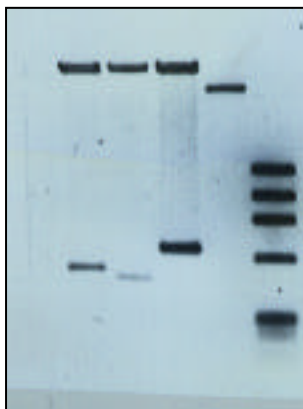
Per a la realització de la HIS necessitàvem produir *ribosondes sense* i *anti-sense* de cadascuna de les seqüències. Les *sondes* per a la HIS havien de ser *sondes* d'RNA que continguessin la seqüència complementària al RNA que volíem estudiar. Per a tal fi partíem dels clons congelats procedents de les clonacions de bandes obtingudes a partir de la RAP-PCR. Els clons congelats procedien de cultius de bacteris *E. Coli* (soca Top F-10) transformats amb el plasmidi pCR 2.1. El plasmidi pCR 2.1 conté la seqüència del promotor de la polimerasa T7, però no de la T3, motiu pel qual havíem de tallar la seqüència del plasmidi i lligar-la a un altre que tingués els dos promotors T3 i T7, per tal de poder fer la síntesi de les dues cadenes d'RNA (sense i anti-sense). Per a dur a terme aquest procés es va procedir de la següent manera:

1. Realitzar una Miniprep seguint el protocol i el Kit *GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep* d'Amersham Pharmacia Biotech® dels clons congelats (Banda dins del plasmidi pCR2.1).



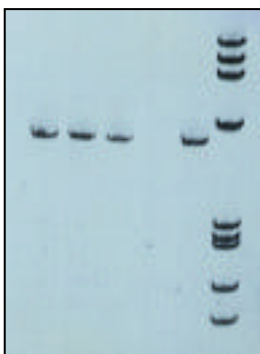
**Figura 15.** Miniprep dels clons congelats. Els inserts es troben en el Plasmidi pCR2.1  
Marcador: FxHae III

2. El producte de la Miniprep es tallava amb els enzims de restricció Xba I i Hind III que tenien *dianes* tant en el *polylinker* del plasmidi original pCR 2.1 com en el del pBluescript II SK, al que volíem lligar la banda.



**Figura 16.** Digestió amb XbaI i Hind III dels plasmidis pCR 2.1 contenint J2 M2 i F8. Al quart carril el plasmidi SK linealitzat

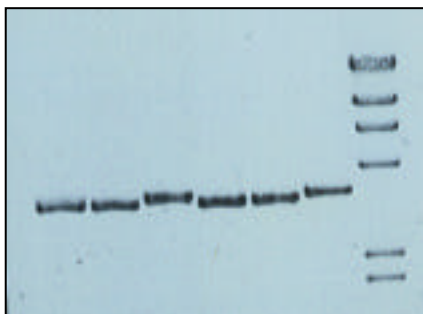
3. El producte de la digestió s'analitzava en un gel d'agarosa al 1%. En ell veiem la banda del plasmidi (pCR 2.1) i la banda tallada, pels punts de tall d'Hind III i Xba I, que es trobava 117 pb més amunt que l'alçada que la banda original .
4. Les bandes digerides (les que contenien l'insert) es retallaven del gel d'agarosa tenyit amb Bromur d'Etidi, visualitzat sota el transil·luminador de llum ultraviolada, i es posaven en l'interior d'un Eppendorf de 1,5 ml per a procedir a la seva purificació. Segons el protocol de *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit d'Amersham Pharmacia Biotech*.
5. El plasmidi Bluescript SK es tallava amb Xba I i Hind III, per a linealitzar-lo, i per crear els punts per al lligatge amb la banda digerida amb els mateixos enzims de restricció. El producte obtingut era retallat del gel d'agarosa i purificat .
6. El DNA obtingut en les passes 4 i 5 (Plasmidi Bluescript SK i banda) es corria en un gel d'Agarosa, per saber la quantitat de producte s'havia recuperat, per tal de calcular la quantitat de DNA que havíem de posar al lligatge.
7. Es realitzava el lligatge entre Plasmidi linealitzat i banda purificada mitjançant l'enzim DNA T4 lligasa (New England Biolabs®) amb el tampó subministrat amb l'enzim (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP, 25 µg/ml BSA, pH 7,5)
8. El procés de lligatge i transformació va ésser el mateix que es va utilitzar per a la clonació de les bandes en el plasmidi pCR 2.1 (ja descrit prèviament)



**Figura 17.** Clons de F8 després del lligatge. Marcador: FxBae III



9. Dels clons obtinguts es va realitzar una Miniprep. D'aquesta manera vàrem aconseguir tenir l'insert dins del plasmidi Bluescript SK
10. Cadascuna de les Minipreps va ésser tallada amb un enzim de restricció (Xba I o Hind III), per a linealitzar-lo, pas necessari per a fer la transcripció a RNA amb T3 i T7 RNA Polimerases. El plasmidi tallat amb Xba I per a la síntesi amb T7 i el plasmidi tallat amb Hind III per a la síntesi amb T7.



**Figura 18.** Plasmidis (SK), contenint l'insert, linealitzats.

## 5.2. Síntesi de la Ribosonda

Per a la realització de la ribosonda es realitzava una reacció de síntesi amb les següents passes:

1. Reacció de Síntesi de la Ribosonda marcada amb Digoxigenina-UTP(DIG) (Roche):

DNA motlle (1µg)	volum variable
DIG RNA labeling mix (10x)	2µl
Tampó de transcripció 10x	2µl
Inhibidor d'RNAases	1µl
Aigua estèril	Fins a 17 µl
-----	
RNA Polimerasa 2u/µl (T3 o T7) (Roche)	3µl

La reacció s'incubava 3 hores a 37°C i posteriorment es seguia el següent protocol per aturar la reacció i precipitar la ribosonda recentment sintetitzada:

1. Afegir al producte de la reacció 2µl de DNAasa lliure de RNAases 10u/µl (Roche)
2. Incubar 15' a 37°C
3. Afegir 2µl d'EDTA
4. Afegir 30 µl d'H<sub>2</sub>O i 25µl de LiCl (Podia prescindir-se de l'aigua per augmentar la precipitació)
5. Precipitar a -20°C durant 1-2 hores
6. Centrifugar a 4°C durant 15' a 13.000 rpm
7. Extreure el sobrenadant
8. Assecar a Temperatura ambient i resuspendre amb 100µl d'H<sub>2</sub>O estèril
9. Per a millorar la dissolució de la Ribosonda es dipositava a 60°C i es practicava un vòrtex.
10. Les Ribosondes es conservaven a -80°C.

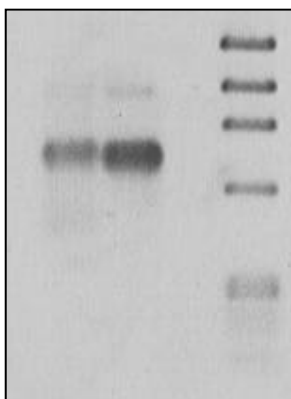
### 5.3. Comprovació de la quantitat i qualitat de les ribosondes

Aquest pas es realitzava mitjançant dues tècniques:

#### 5.3.1. Gel d'Agarosa al 1%

Les ribosondes obtingudes eren estudiades en un gel d'agarosa al 1% per a comprovar la quantitat i la qualitat de RNA obtingut.

Hind III XbaI Hae III



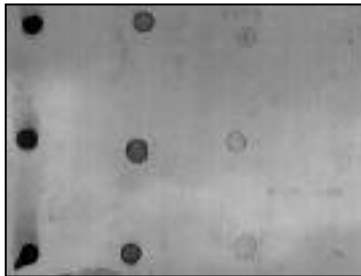
**Figura 19.** Comprovació de la qualitat de la ribosonda mitjançant un gel d'Agarosa 1% Marcador: FxHae III

#### 5.3.2. Dot Blot

Posteriorment es realitzava un Dot Blot per a comprovar la quantitat de sonda i la qualitat del marcatge amb Digoxigenina. Per a tal fet es procedia de la següent manera:

1. Es posava 1µl de la mostra a estudiar sobre una membrana d'hibridació (PALL) junt amb una recta patró de concentracions conegudes de digoxigenina.
2. Es deixava assecar \_ hora a Temperatura ambient
3. Es fixava a la membrana mitjançant l'exposició durant 2' a llum UV i posteriorment s'introduïa en un tub d'hibridació.
4. Es rentava 5' amb PBS
5. Incubació de 15' amb PBS-4% BSA

6. Incubació de 15' amb PBS-4% BSA + 1/5000 antidigoxigenina 0.75u/μl (Roche)
7. Rentar 2x 15' amb PBS
8. Incubar 5' amb NTMTL (Genius Buffer)
9. Incubar amb 45μl de NBT + 35μl de BCIP + 10 ml de Genius Buffer (en la foscor i anar controlant el revelat)
10. Calcular la concentració de sonda marcada de que disposàvem.



Patró

T3

T7

Figura 20. Dot Blot

#### 5.4. Protocol de Hibridació in situ

La tècnica de la HIS es va realitzar sobre seccions de 5-7 μ de gruix tallades en criostat i col·locades en portaobjectes carregats elèctricament per augmentar l'adherència del talls. El protocol de la HIS es va realitzar dins de "cubetes de tinció" a on els talls quedaven submergits en les diferents solucions.

##### 1er dia

1. Treure els talls del congelador i deixar-los a temperatura ambient durant 1 hora
2. Rentar amb PBS 2x5' 1 2

##### PBS

Per 1 litre: 25 ml de PB 0.4M + 30 ml de NaCl 5M i fins a 1 litre d'H<sub>2</sub>O

##### **Deshidratació i Rehidratació**

3. Etanol 50% 5' (25 ml OH + 25 ml H<sub>2</sub>O)
4. Etanol 70% 5' (35 ml OH + 15 ml H<sub>2</sub>O)
5. Etanol 90% 30" (45 ml OH + 5 ml H<sub>2</sub>O)
6. Etanol 100% 30"
7. Etanol 90% 30"
8. Etanol 70% 5'
9. Etanol 50% 5'

10. **PBS Tritó 0.2% 10'**

##### PBS Tritó 0.2%

Per 50 ml: 50ml de PBS + 100μl de Tritó

11. Rentat amb PBS Tween (Tw) 0.1% 3x5' 1 2 3

PBS Tw al 0.1%

100µl de Tween per cada 100 ml de PBS

12. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% en PBS Tw 30'

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% en PBS Tw

3ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i fins a 50 ml de PBS Tw

13. Rentat amb PBS Tw 0.1% 3x5' 1 2 3

14. HCl 0.2 N 10'

15. Rentat amb PBS Tw 0.1% 3x5' 1 2 3

16. TEA + Anhídrid Acètic 10'

TEA + Anhídrid Acètic

Per 50 ml de : 0,75 ml de Trietanolamina +  
1,65 ml d'HCl 2N +  
125µl d'Anhídrid Acètic  
i fins a 50 ml de H<sub>2</sub>O

17. Rentat amb PBS Tw 0.1% 3x5' 1 2 3

18. Paraformaldèhid 4% en PBS 10'

S'ha de preparar al moment i dissoldre-ho a 60°C a la campana d'extracció.

19. Rentat amb PBS Tw 0.1% 3x5' 1 2 3

20. Glicina 2mg/ml en PBS Tw

21. Rentat amb PBS Tw 0.1% 2x5' 1 2

22. Tampó de prehibridació (Per a 10 ml)

Formamida desiontzada	5 ml
Dextran Sulfat 50%	2 ml
Denhardt's 100x	0,5 ml
NaCl 5M	1,25 ml
EDTA 0,5M PH 8.0	0,2 ml
Pipes Na 1M pH 6,8	0,2 ml
SDS 20%	0,1 ml
H <sub>2</sub> O	0,25 ml

+ 250 µl de DNA d'esperma de Salmó (Sigma)

+ 250 µl de Yeast RNA

(Ambdós prèviament escalfats a 80° C i posats immediatament en gel)

Posar-hi aproximadament 250 µl de tampó de prehibridació a sobre de cada porta, tapar-ho amb un cobreobjectes i posar-ho en una cambra humida dins un forn a 60°C durant 3 hores.

Passades les 3 hores es treu la cambra humida del forn i es posa el tampó d'hibridació

### 23. Tampó d'hibridació (TH)

Posem aproximadament 250µl tampó d'hibridació en cada porta. El tampó d'hibridació és igual que el de prehibridació afegint però la sonda.

Hem d'aconseguir que hi hagi entre 600 i 1000 ng de sonda per cada ml de tampó d'hibridació. La quantitat de sonda, per tant, dependrà de la quantitat de marcatge que tingui la sonda (veure la figura 20)

S'ha de desnaturalitzar la sonda 5 minuts a 80° i posar-ho immediatament en gel.

Exemple: Per una sonda que tingui un marcatge de 100ng/µl hauríem de posar entre 5 i 10 ml de sonda per cada ml de T 'd'H (Ho hem fet aproximadament amb 600 ng per ml de TH)

Incubació en el Tampó d'hibridació, a 60°C, entre 14-16 hores.

### 2on dia

24. 5x SSC + 50% Formamida 2x30' a temperatura ambient

#### 5x SSC + 50% Formamida

25 ml de Formamida

12,5 ml de 20x SSC

12,5 ml d'H<sub>2</sub>O

Preescalfar el TEN a 37°C

25. 2x SSC 3x5'

#### 2x SSC

45 ml d'H<sub>2</sub>O + 5 ml de 20x SSC

26. TEN + 20µg/ml d'RNasa A 1 hora a 37°C

#### TEN + RNasa

Per 50 ml:

1ml Tris 0,5 M pH 7,5

5 ml NaCl

0,5 ml EDTA 0,5 M pH 8.0

100µl d'RNasa A

Fins a 50 ml d'H<sub>2</sub>O

27. Rentar amb 0,5x SSC + 50% de Formamida 4x 30' a 55°C 1 2 3 4

#### 0,5x SSC + 50% de Formamida

Per 200ml:

100ml de Formamida

5ml de 20x SSC

95ml d'H<sub>2</sub>O

28. Rentar amb 0,1x SSC + 0.5% N-lauroyl-sarcosinat sòdic 2x 30' a 55°C

#### 0,1x SSC + 0.5% N-lauroyl-sarcosinat sòdic 2x

Per 100 ml:

500 µl de SSC 20x

99,5 ml d'H<sub>2</sub>O

0,5 gr de N-lauroyl-sarcosinat sòdic

29. TBST 1x + Levamisole (0,48 g/l) 3x5'

#### TBST 10x

Per 200 ml:

54 ml de NaCl 5M

20 ml de KCl 0,3 M (5,6 gr de KCl en 250 ml H<sub>2</sub>O, dissoldre 2h a 40° i autoclavar)

50 ml Tris HCl 1M pH 7,5

( 60,55 gr de Tris Base en 350 ml d'H<sub>2</sub>O, ajustar el pH amb HCl concentrat i enrasar a 500 ml)

76 ml H<sub>2</sub>O

2 ml de Tween 20

#### TBST 1x + Levamisole

Per 700ml :

70 ml de TBS 10x

630 ml H<sub>2</sub>O

0,33 gr de Levamisole

30. Bloqueig: 10% Normal Goat sèrum (NGS) en TBSTL 1x (TBS 1x Tween +Levamisole)

Per 3 ml de solució: 2250 µl TBSTL + 250 µl NGS

31. Anticòs antidigoxigenina 1:2000 en 1% OVN 4°C

Per 2ml de solució: 1980 µl TBSTL + 20 µl NGS + 1µl d'Ac (Ac antidigoxigenina)

### 3er dia

32. Deixar a temperatura ambient 1h

33. TBST 1x 7x 10' 1 2 3 4 5 6 7

34. NTMTL 3x10' 1 2 3

#### NTMTL:

20 ml Na Cl 5M

100 ml Tris HCl 1M pH 9,5

( Dissoldre 121 g de Tris Base en 800 ml d'H<sub>2</sub>O + aprox. 6 ml HCl concentrat , enrasar a 1 l i autoclavar)

50 ml MgCl<sub>2</sub> 1M

1 ml Tween 20

+ 0,48 g/l de Levamisole (el dia d'us)

35. Revelat:

Preparar 4,4 µl NBT + BCIP /ml de solució NTMT (protegint de la llum)

#### Per 3 ml de solució:

13,2 µl d'NBT + 9,9 µl BCIP. Filtrar la solució amb 0,22µl low binding protein

Incubar en fosc

36. Rentar amb PBS, com a mínim 1 hora

37. Muntar amb Mowiol

## 6. Anàlisi bioinformàtica

Inicialment les seqüències es comparaven mitjançant el programa **BLAST** (Alschul et al., 1990) amb la base de dades **nr** del **NCBI** per obtenir homologies a nivell de *gen* i la màxima similitud possible d'espècie (*Rattus Norvergicus*). Posteriorment s'introdueixen les seqüències a la base de dades del projecte **Ensembl** a on cercàvem les homologies i la distribució en els cromosomes humans. Per últim les seqüències eren estudiades amb el programa **BLAST** en la base de dades del genoma humà d'**University of California at Santa Cruz (UCSC)** per estudiar l'homologia de les nostres seqüències amb gens humans.

En el cas de la seqüència F8 hem utilitzat el programa **translating-BLAST** a la base de dades **nr** de la **NCBI** per cercar homologies amb proteïnes de la seqüència *traduïda* de nucleòtids. Els alineaments de seqüències per cercar el percentatge d'homologia s'han realitzat amb el programa **Pairwise BLAST** de la **NCBI**.



[Standard nucleotide-nucleotide BLAST \[blastn\]](#)



<http://www.ensembl.org/perl/blastview>



[Nucleotide query - Protein db \[blastx\]](#)



<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>

**BLAST 2 SEQUENCES**

[BLAST 2 Sequences](#)

