

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

MATERIALS

MÈTODES

RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

Resultats previs sobre el que es basen els objectius d'aquesta tesi

Com ja s'ha esmentat en la introducció, la naturalesa molecular de la regulació gènica específica de teixit duta a terme pels andrògens no està encara ben definida. El ronyó murí, teixit llargament utilitzat per l'estudi d'aquests fenòmens, ofereix una sèrie d'avantatges entre d'altres per l'existència de varis gens força ben caracteritzats amb expressió depenent dels andrògens; malgrat aquest fet, però, aquests models gènics vigents ofereixen alhora certes restriccions per l'estudi d'aquests fenòmens, com les de presentar una regulació incompleta o una gran variabilitat en llur resposta i expressió.

Amb aquestes premisses, en el nostre laboratori va iniciar-se un projecte amb l'objectiu d'establir nous models gènics més informatius, mitjançant la identificació de gens alternatius l'expressió dels quals es trobés forta i coordinadament regulada pels andrògens en el ronyó de ratolí.

Així doncs, amb una aproximació combinada fent ús de dos tècniques complementàries (la *Random Arbitrarily Primed PCR*, RAP-PCR, i la *Representational Difference Analysis of cDNA*, RDA), vàlides per identificar gens d'expressió diferencial entre dos teixits o dos situacions donades, es va procedir a l'anàlisi del mRNA renal obtingut del sistema 'femella C57BL/6 *versus* femella C57BL/6 tractada amb dihidrotestosterona (DHT) durant 8 dies'. L'aplicació de les dos tècniques anomenades va rendir una sèrie de fragments de cDNA representatius *a priori* de gens amb una expressió renal regulada en resposta als andrògens, que van ser convenientment clonats i seqüenciats [133].

Entre aquests fragments identificats se'n trobaven de corresponents a gens de regulació androgènica ben coneguda, com el del *Kap* (*kidney androgen-regulated protein*), però d'altres sense cDNAs complert coneguts encara i de regulació no descrita a ratolí, que per assignació (en base a la seva homologia) s'identificaren com formes homòlogues als gens *S_A* i *Oatp1* de rata [270, 190], i fins i tot un fragment de cDNA amb una seqüència sense cap homòleg a les bases de dades de l'època, al qual s'anomena MJAM. A la *taula XV* s'indica els noms i les identitats del conjunt totes les bandes de cDNA obtingudes i clonades amb les tècniques del RDA i del RAP en el treball referit [133].

Un altre dels gens identificats en aquest estudi previ va ser el corresponent al citocrom P450

TAULA XV. Identificació dels clons diferencials de cDNA obtinguts en el treball de Melià et al., [133]. Amb sobreimpresió colorejada s'indiquen els clons de partida amb els quals s'ha iniciat el treball experimental de tesi doctoral

TABLE 1. Identification of differential cDNA clones obtained by RAP-PCR and cDNARDA

Clone	Primer	Putative identification	Species	%ID	Length (nt)	Accession
1-1 RAP	MAYA	Interleukin-6 signal transducer (gp130)	Mouse	96	165	MUSGP130A
2-1 RAP	MAYA	Kidney androgen-regulated gene (KAP)	Mouse	97	149	MUSKAPG
3-1 RAP	α -T3A	Testosterone 16- α -hydroxylase	Mouse	90	293	MUSTHAB
2-1 RDA	—	SA	Human	79	148	HSSAMRNA
3-1 RDA	—	Histone H1(o)	Mouse	94	98	MMHISH10
4-1 RDA	—	MJAM	Mouse	—	452	MMU90332
5-1 RDA	—	CYP4B1	Mouse	98	265	MUSCYP4B1
6-1 RDA	—	CYP4B1	Mouse	96	161	MUSCYP4B1
7-1 RDA	—	Organic anion transporter (OATP)	Rat	83	285	RATOATP
8-1 RDA	—	SA	Human	86	67	HSSAMRNA
9-1 RDA	----	Endogenous murine leukemia virus	Mouse	94	216	MUSGAGPOEN

Sequences have been compared with those in GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, and dbEST sequence database, through the BLAST program. Primer column indicates the random oligonucleotide that was used to generate each cDNA clone. The table shows the highest identity of the longest fragment that matched with a database sequence.

4b1, el cDNA complet del qual ja era conegut a ratolí i havia estat clonat prèviament [139], però igualment als anteriors, amb una expressió renal dimòrfica veient-se sobreexpressat en ratolins mascle. A la *figura 31* s'il·lustra la comprovació de l'expressió diferencial per *northern-blot* d'alguns dels gens esmentats.

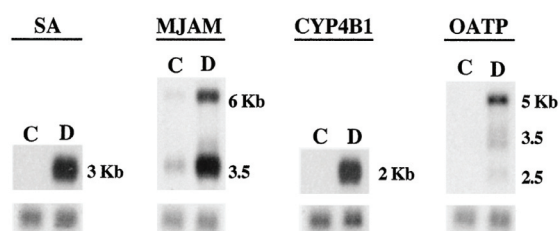


FIG 31. Gens regulats pels andrògens a ronyó de ratolí. Anàlisi per *Northern-blot* dels gens sobreregulats per andrògens, detectats mitjançant RAP cDNA. (C) indica mRNA renal de femelles control i (D) indica mRNA de femelles tractades amb DHT. (Extret i modificat de Melià *et al.*, [133])

Objectius concrets

El treball d'aquesta tesi s'inicia a partir d'aquests resultats previs obtinguts al laboratori, emmarcant-se consegüentment en el clonatge i la caracterització d'alguns dels gens identificats de forma preliminar (*Cyp4b1*, *Oatp1* i *Oatp-d*), com a primera etapa en la generació de nova informació útil pel l'estudi i el discerniment dels mecanismes a nivell molecular de govern de l'expressió, per part de les hormones esteroidals andrògenes.

En base a les consideracions esmentades, s'han proposat els **objectius** generals següents:

1. Caracteritzar el *Cyp4b1* en termes de patró d'expressió i regulació renal androgènica.
2. Clonar i caracteritzar el gen del *Cyp4b1* juntament amb la seva regió promotora
3. Avaluar a nivell molecular la regió promotora citada en assaigs d'activitat transcripcional *in vitro* en línies cel·lulars renals.
4. Clonar el cDNA sencer murí corresponent als clons 7.1RDA i 5.1RDA (representatius dels transportadors d'anions orgànics *Oatp1* i *MJAM/Oatp-d*, respectivament).
5. Caracteritzar els cDNAs anteriors i aprofundir en el coneixement de la seva funció, expressió i regulació hormonal

L'aprofundiment en l'estudi d'aquests gens permetrà avançar en la comprensió tan dels mecanismes moleculars que controlen la regulació gènica per mitjà de la regulació hormonal, així com dels que controlen i la restringeixen a nivell de teixit.

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

MATERIALS

MÈTODES

RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

MATERIALS

1. ANIMALS I TEIXITS

1.1. RATOLINS



S'han utilitzat ratolins (*Mus musculus*) de les següents soques consanguínies:

- C57BL/6 (color negre)
- BALB/c (color albi)
- 129/SvPasIco (color agoutí)

Tots els animals s'han adquirit al criador IFFA CREDO a l'edat de 6-7 setmanes, estabulant-se a temperatura constant (22°C) en les dependències del centre en règims de llum/foscors de 12 h, alimentats amb dieta estàndard [PANLAB] i aigua *ad libitum*.

Es pot trobar informació exhaustiva en línia sobre aquestes soques a la següent pàgina web:

<http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/STRAINS.shtml>

1.2. RATES



S'han utilitzat rates (*Rattus norvegicus*) mascle de les següents soques:

- Wistar-Kyoto (WKY/NIco)

Característiques generals: Albines(c), rates derivades originalment a partir d'un *stock* no consanguini de rates Wistar a la facultat de medicina de Kyoto, fetes consanguínies per entrecreuaments successius com a soca control normotensa de les *SHR*.

- Rates hipertenses espontànies, *spontaneous hypertensive rats* (SHR/NIco)

Característiques generals: Albines (c), soca genèticament hipertensa derivada originalment a partir de les Wistar-Kyoto per entrecreuaments successius entre germans [271], seleccionant-se contínuament els individus amb pressió sanguínia elevada, en absència d'estímuls ambientals o dietètics.

Les rates es van obtenir del criador IFFA CREDO a l'edat de 6 setmanes, estabulades en condicions anàlogues a les descrites anteriorment.

Es pot trobar informació addicional sobre aquestes soques a les següents pàgines d'internet:

<http://www.informatics.jax.org/external/festing/rat/docs/SHR.shtml>

<http://www.informatics.jax.org/external/festing/rat/docs/WKY.shtml>

1.3. GRANOTES



S'han utilitzat granotes femella madures de l'espècie *Xenopus laevis* obtingudes de la *African Xenopus facility c.c.*, R. Noordhoek, Sud-àfrica. Els batracis han estat mantinguts en condicions estàndard [272] a la *facility* del *Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung für Innere Medizin, Zürich*, Suïssa*.

Breument, es mantenen en tancs d'aigua amb 15-20 litres d'aigua per animal que s'ha de canviar sovint. Se les manté termostàticament a 19°C, i en un cicle de llum/foscors de 12 hores, alimentant-les dos dies a la setmana.

*La part experimental referent a la manipulació de granotes ha estat realitzada a Suïssa, als laboratoris del Prof. Peter Meier de la Universitat de Zürich.

1.4. PROCEDIMENTS QUIRÚRGICS I TRACTAMENTS HORMONALS

Castració

Tan els ratolins com les rates mascle van ser gonadectomitzats quirúrgicament per extirpació testicular. Els animals van ser anestesiats intraperitonealment (0,5 mL / 25 g de pes) mitjançant la barreja anestèsica formada per *dehidrobenzperidol* (Droperidol®, SYNTEX) i *midazolam* (Dormicum®, ROCHE) ambdós a 1:6 (v/v) en H₂O destil·lada estèril.

En el cas dels ratolins (operats a les 7 setmanes d'edat), es realitzà una petita incisió abdominal a través de la qual es procedí a extreure la totalitat de la massa testicular de l'animal; tan la pell com la paret peritoneal van ser suturades independentment amb varis punts. Pel cas de les rates (a l'edat de 9 setmanes), l'extirpació gonadal s'aconseguí mitjançant una petita incisió escrotal, per on quedaren exposats els dos testicles corresponentsels quals es van eliminar íntegrament; la ferida ocasionada es va cosir amb fil quirúrgic.

Els animals operats es van deixar recuperar una setmana com a mínim, abans de l'inici dels tractaments pertinents o d'altres accions.

Tractaments amb andrògens

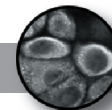
El tractament farmacològic amb andrògens dels animals castrats es va realitzar mitjançant la implantació subcutània (dorsalment a l'alçada del clatell) d'implants silàstics obtinguts del proveïdor *Innovative Research of America* (IRA), alliberadors de dihidrotestosterona (DHT) o de vehicle (en els cas dels animals control), tal com ja ha estat descrit [133]. Els *pellets* implantats d'hormona o vehicle van ser mantinguts per un període de 8 dies (amb una dosi aproximada d'alliberació de DHT de 19 µg/dia), al termini dels quals es va sacrificar als animals receptors mitjançant dislocació cervical, recuperant-ne el fetge i els dos ronyons corresponents, entre d'altres teixits.

Extracció de teixits

Un cop finalitzats els tractaments corresponents, els animals es van sacrificar per dislocació cervical. A continuació, es van recollir immediatament els ronyons en condicions lliures de RNases, descapsulant-los tot seguit abans de ser congelats; segons el cas, també es van extreure altres òrgans que al igual que els anteriors es congelaren de cop submergint-los en N₂ líquid. Les mostres de teixit destinades per hibridació *in situ*, van ser col·locades a l'interior de criomotlles de plàstic de mida adequada (LIPSHAW), immersits en el criopreservant OCT (*OCT embedding compounds*, MILES LABORATORIES) i congelant-ho ràpidament en isopentà (FLUKA) refredat en N₂ líquid.

Tos els procediments experimentals amb animals s'han realitzat d'acord amb les normatives Institucionals vigents, en compliment dels requeriments establerts pel Govern Nacional i per la Unió Europea (*Real Decreto 223/1988: B.O.E. N° 256, 10/25/1990*).

2. LÍNIES CEL·LULARS



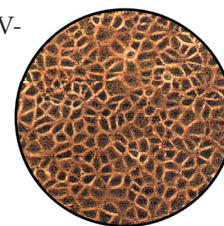
2.1. CÈL·LULES

En els diferents estudis en que s'ha requerit l'ús i cultiu de cèl·lules eucariotes, s'han utilitzat les següents línies cel·lulars de mamífer:

PKSV-PCT3

Línia cel·lular epitelial immortalitzada, derivada de túbul proximal renal murí. S'han obtingut a partir del ronyó de ratolins transgènics per l'antigen *T*-gran i *t*-petit del virus de simi 40 (SV40), als quals se'ls va extreure per microdissecció la porció contorta del túbul, d'on es van establir les cèl·lules [131]. La línia conté integrat doncs, el transgen dels antigens *T* i *t* del virus SV40, sota el control del promotor del gen de la *piruvat kinasa* de rata. La sub-línia PCT3, ha estat subclonada per dilució límit a partir de la línia parental PKSV-PCT [58].

FIG 32. Monocapa de cèl·lules de la línia PR10



PKSV-PR10

Línia epitelial immortalitzada, derivada com l'anterior de túbul proximal renal murí, però en aquest cas a partir de la porció recta del túbul [131]. Obtinguda anàlogament a les cèl·lules PKSV-PCT per carcinogènesi dirigida, creix en monocapes adherents que tenen la capacitat –al igual que la seva línia “germana” PCT– de formar *domes* quan es cultiven varis dies post-confluència [132]. La sub-línia PR10 (Fig 32), ha estat subclonada per dilució límit a partir de la línia parental PKSV-PR [133].

MDCK

Línia renal canina, derivada originàriament per S. Madin i N.B. Darby l'any 1958 [273] a partir de ronyó normal de gos adult femella (*Canis familiaris*, de raça *cocker spaniel*). de morfologia epitelial, forma monocapes polaritzades (Fig 33) utilitzant-se sobretot en estudis de transport i *sorting* de proteïnes. Han estat cedides amablement pel Dr. Antonio Garcia de Herreros, de l'IMIM. ATTC Catàleg n° CCL-34.

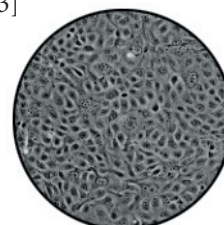


FIG 33. Cèl·lules de la línia MDCK

CV-1

Línia renal normal de primat, derivada a partir de ronyó de mona verda africana (*Cercopithecus aethiops*) mascle adulta [274]. Presenten morfologia epitelial de tipus fibroblast. Han estat obtingudes de l'ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA), n° CCL-70.

HEK293

Línia renal humana permanent, establerta a partir de ronyó primari embrionari que va ser transformat amb DNA fragmentat de l'adenovirus humà tipus 5 [275]. Presenta morfologia epitelial fibroblastoide, caracteritzant-se especialment per produir quantitats elevades de proteïna; disponible a ATCC amb el n° CRL-1573. Han estat cedides amablement pel Dr. Bruno Stieger de la Universitat de Zürich.

HepG2

Línia cel·lular hepàtica tumoral humana, establerta a partir de teixit cancerós d'un pacient afectat amb carcinoma hepatocel·lular [276]. De tipus epitelial, creix en monocapa formant petits agregats. han estat cedides amablement pel Dr. Emili Itarte, de la Universitat Autònoma de Barcelona. (ATTC Catàleg n° HB-8065).

2.2. MEDIS DE CULTIU

Totes les línies cel·lulars amb les que s'ha treballat han estat mantingudes i expandides a 37°C en un incubador amb atmosfera humida (al 5% en CO₂), seguint els procediments i les pràctiques estàndard requerides pel treball amb cultius en condicions estèrils [277].

A continuació es descriu la formulació utilitzada per preparar els medis de cultiu de les diferents línies cel·lulars. Tots els procediments de preparació han estat realitzats en condicions estèrils.

Medi PKSV-PCT3 /PKSV-PR10

Component	Concentració	Proveïdor	Referència
DMEM	50% (v/v)	GIBCOBRL	011880-028M
Ham's F12	50% (v/v)	GIBCOBRL	31765-027M
HEPES pH 7,4	20 mM	GIBCOBRL	03025-027M
Glutamina	2 mM	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-020-1B
D-(+)-Glucosa	12,5 mM	SIGMA	G-7021
Transferrina	5 µg/mL	SIGMA	T-1438
Insulina	5 µg/mL	SIGMA	I-6634
Dexametasona	50 nM	SIGMA	D-8893
Triiodotironina	1 nM	SIGMA	T-5516
Selenat de sodi	30 nM	SIGMA	S-9133
EGF	10 ng/mL	SIGMA	E-4127
Sèrum boví fetal	2% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	10106-060
Penicil·lina / Estreptomicina	100 U/mL 100 µg/mL	GIBCOBRL	15240-052

Medi CV-1

Component	Concentració	Proveïdor	Referència
DMEM high glucose	1:1	BIOLOGICAL INDUSTRIES	01-055-1A
Piruvat sòdic	1% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-042-1
Sèrum boví fetal	10% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	10106-060
Aminoàcids no essencials	1% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	01-340-1B
Penicil·lina / Estreptomicina	100 U/mL 100 µg/mL	GIBCOBRL	15240-052

Medi HepG2

Component	Concentració	Proveïdor	Referència
RPMI 1640	1:1	BIOLOGICAL INDUSTRIES	01-104-1A
Sèrum boví fetal	10% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	10106-060
Glutamina	2 mM	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-020-1B
Penicil·lina / Estreptomicina	100 U/mL 100 µg/mL	GIBCOBRL	15240-052

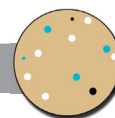
Medi MDCK

Component	Concentració	Proveïdor	Referència
DMEM high glucose	1:1	BIOLOGICAL INDUSTRIES	01-055-1A
Sèrum boví fetal	10% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	10106-060
Aminoàcids no essencials	1% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	01-340-1B
Glutamina	2 mM	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-020-1B
Penicil·lina / Estreptomicina	100 U/mL 100 µg/mL	GIBCOBRL	15240-052

Medi HEK293

Component	Concentració	Proveïdor	Referència
MEM	1:1	SIGMA	M-2279
Sèrum boví fetal	10% (v/v)	BIOLOGICAL INDUSTRIES	10106-060
Glutamina	2 mM	BIOLOGICAL INDUSTRIES	03-020-1B
Penicil·lina / Estreptomicina	100 U/mL 100 µg/mL	GIBCOBRL	15240-052

3. SOQUES BACTERIANES

TAULA XVI. Soques bacterianes d' *Escherichia coli* utilitzades

Soca	Genotip	Característiques	Referència
TOP10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Soca comercial optimitzada pel clonatge de tot tipus de plasmidis. Permet fer la selecció blau/blanc sense haver d'afegir IPTG a les plaques. Presenta una elevadíssima eficiència de transformació.	<i>Catàleg Invitrogen</i> , pàg. 132 (2003)
JM109	recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(rK ⁻ , rK ⁺) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F ⁻ traD36 proAB lacI ^q ZΔM15]	Soca deficient en recombinases utilitzada per el creixement i la clonació de plasmidis. Presenta una elevada eficiència de transformació. Permet realitzar l' <i>screening</i> blau/blanc en presència d'IPTG i d'X-gal	[278]
XL1-Blue MRA (P2)	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac (lisògena per P2)	<i>host strain</i> lisògena pel bacteriòfag P2, utilitzada per l'amplificació i la propagació dels fags λ recombinants	<i>Catàleg Stratagene</i> , pàg. 82 (2002)

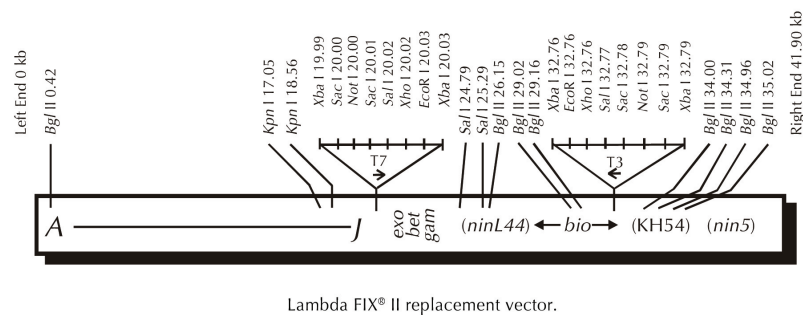
4. VECTORS



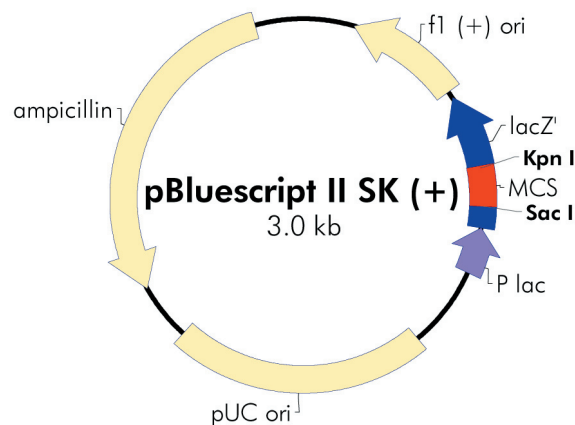
A continuació es descriuen alguns dels vectors més rellevants utilitzats en aquest treball experimental, tractant-se tan de vectors de tipus plasmídic i fagèmids, com basats en el bacteriòfag λ .

lambda FIX II

Vector recombinant de reemplaçament utilitzat per clonar grans fragments de DNA genòmic. Amb ell s'ha construït una llibreria genòmica comercial de ratolí en fags lambda (STRATAGENE). Disposa dels promotors de T7 i T3 per seqüenciar des de els extrems de l'insert, així com de dianes *NotI* per alliberar els DNA genòmic clonat

***pBluescript II***

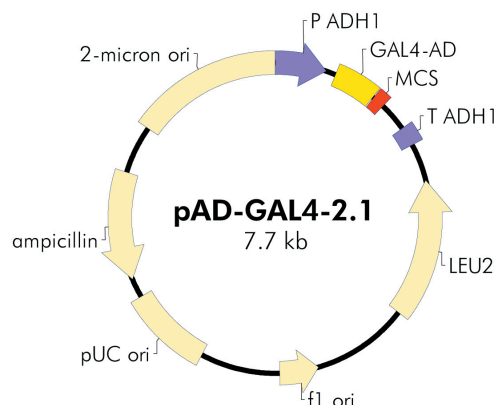
Vector multicòpia de clonació per a propòsits generals de clonatge. Disposa d'un *polylinker* amb nombroses dianes de restricció disponibles, selecció blau/blanc dels recombinants i resistència a ampicil·lina.

***pAD-Gal4***

Vector d'expressió amb el que s'ha construït una llibreria renal de cDNA's murins. Aquesta llibreria comercial (subministrada per STRATAGENE) ha estat realitzada a partir de cDNA doble cadena clonat en els llocs *EcoRI-XhoI* del vector, i que ha estat sintetitzat a partir de mRNA de ronyó de ratolí mascle adult, utilitzant com a primer unidireccional oligo(dT).

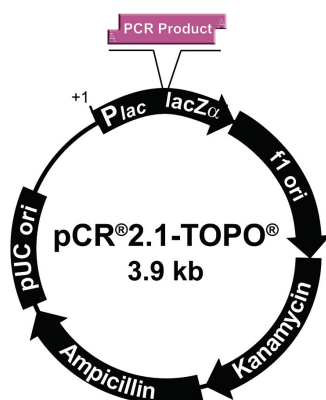
Malgrat estar pensada per a ser utilitzada en experiments de doble híbrid, en el treball experimental que ens

ocupa, aquesta llibreria ha estat utilitzada com a font per a ser rastrejada a la cerca de clons *full-length* de cDNA renal murí. Confereix resistència a ampicil·lina als transformants d'*E. coli*.



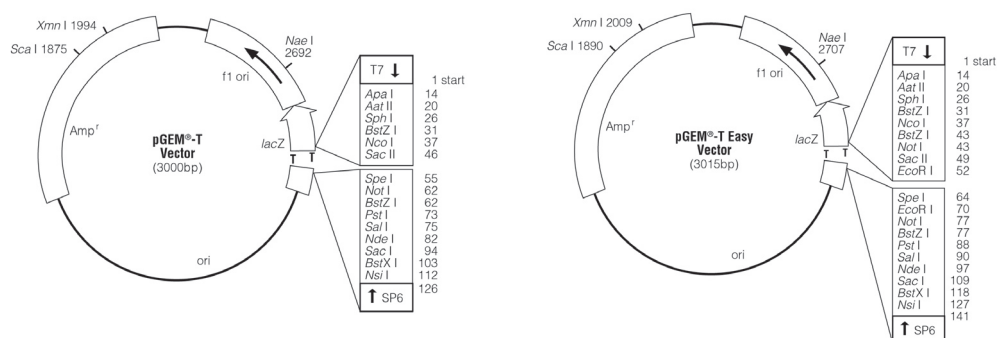
pCR2.1-TOPO

Vector plasmídic de la casa comercial INVITROGEN preparat per a servir en el clonatge de productes de PCR basat en el mètode “TA”. Es serveix linearitzat amb llurs extrems activats amb la unió covalent de l'enzim *Topoisomerasa I*, que afavoreix l'acomodació del DNA a clonar.



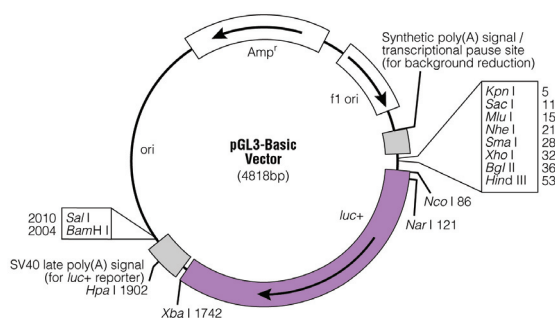
pGEM-T i pGEM-TE

Plasmidis recombinants que permeten el clonatge directe de productes de PCR, ja que contenen uns extrems que poden complementar amb els del productes d'amplificació. Es diferencien amb l'absència (pGEM-T) o presència (pGEM-TE) d'una diana *EcoRI* flanquejant a costat i costat de l'insert que en facilita l'alliberament per digestió. (Mapes dels plasmidis a la pàgina següent).



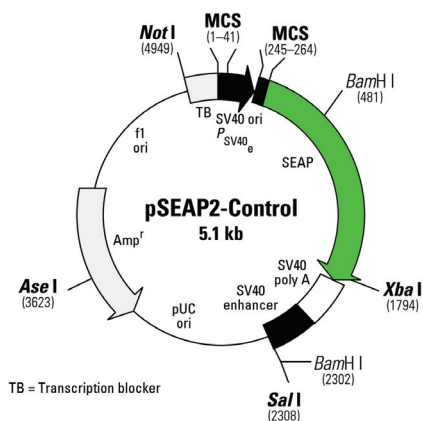
pGL3-Basic

Plasmidi reporter per a l'anàlisi de seqüències promotores i reguladores. Permet la clonació del fragment de DNA d'interès fusionats amb la seqüència codificant del gen luciferasa, l'activitat de la qual servirà d'indicador de la capacitat d'activació transcripcional del fragment de promotor clonat, en assaigs de transfecció transitòria.



pSEAP2-Control

Plasmidi d'expressió en cèl·lules eucariotes de l'enzim reporter fosfatasa alcalina secretada (SEAP) sota el control del promotor víric del SV40, utilitzat com a control de l'eficiència de transfecció. La presència d'elements com el *early promoter* i l'*enhancer* del SV40 asseguren uns nivells d'expressió elevats en la majoria de línies cel·lulars.

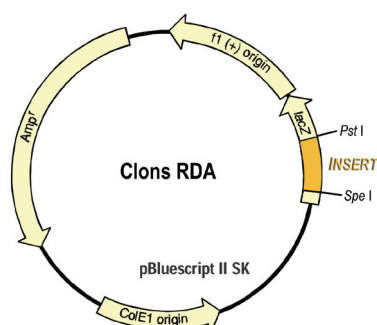


pSV-AR₀

Plasmidi d'expressió del receptor d'andrògens (AR) humà sota el control del promotor víric del SV40. S'ha utilitzat per expressar heteròlogament el AR en transfeccions transitòries. Ha estat descrit prèviament per Balbin, M. *et al.*, [285].

Clons RDA

Clons plasmídics recombinants que contenen inserts amb fragments de cDNA de ronyó de ratolí, obtinguts mitjançant la tècnica de *representative differential analysis of cDNA* (RDA) efectuada per clonar gens diferencialment expressats per acció dels andrògens; Estan subclonats en el vector pBluescriptII en el lloc de restricció *Bam*HI, tal i com es descriu a Melià, MJ *et al.*, [133].



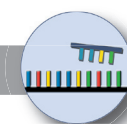
TAULA XVII. Clons RDA

Nom	Identificació insert	Mida (kb)
5.1RDA	<i>Cyp4b1</i>	0,26
7.1RDA	<i>Oatp1</i>	0,28
4.1RDA	<i>MJAM</i>	0,45

5. REACTIUS QUÍMICS

Els reactius i productes químics utilitzats han estat els de la màxima puresa disponible, compatibles amb una aplicació en tècniques bioquímiques i de biologia molecular. Els principals subministradors han correspost a les cases comercials MERCK, SIGMA-ALDRICH, BOEHRINGER-MANHEIM/ROCHE, PANREAC, i FLUKA, entre d'altres.

Pel que fa l'obtenció de compostos marcats amb isòtops radioactius, majoritàriament nucleòtids com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ i $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, com també alguns substrats marcats amb $[^3\text{H}]$, els principals subministradors han estat AMERSHAM PHARMACIA i NEW ENGLAND NUCLEAR.

6. OLIGONUCLEÒTIDS

En general, els oligonucleòtids utilitzats han estat dissenyats intentant escollir les parelles de primers que presentessin unes característiques de llargària i T_m semblants, per tal de que oferissin unes condicions d'amplificació òptimes. La majoria s'han dissenyat utilitzant el programa *oligo*® 4.02 primer analysis software i també *on-line* a través de la web http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi, [279]. Els proveïdors encarregats de la seva síntesi han estat BOEHRINGER MANHEIM i TIB® MolBIOL Syntheselabor (Berlin).

A continuació es detallen les característiques dels principals *primers* utilitzats en aquest treball. No s'hi ha inclòs els *primers* d'ancatge en vectors ni els estàndar com el de T7 o T3.

TAULA XVIII. Oligonucleòtids

Nom	Seqüència (5'-3') ^a	T _m (°C)	Orientació	Comentaris
mCYP4B1 23	CGCTCAGCTTTCTCTCTCCAAG	59	<i>fwd</i>	5'-RACE & <i>primer extension</i>
mCYP 103L	GGATCACTACAGAAGCCCACA	59	<i>rev</i>	
mCYP4B1 218	AGGCCTCCTGTCTTCTGGATCT	62	<i>rev</i>	
mCyp4b1 478r	CATAGGGCTTCAGCACATCA	60	<i>rev</i>	
mCyp4b1 459f	TGATGTGCTGAAGCCCTATG	57	<i>fwd</i>	RT-PCR
mCYP4B1 1695r	AAAGCCCAGGCATTGAATC	54	<i>rev</i>	
Cyp -83/N	gtccatggTCAGTGCCCCGTATCCAGA	60 ^b	<i>fwd</i>	Construcció dels plasmidis reporters
Cyp -1022/N	ctccatggCAGTTCCCTTTGCCAATGTT	58 ^b	<i>fwd</i>	
Cyp -153/N	gccccatggCTTTGAGGCAGCTATCTCCG	56 ^b	<i>fwd</i>	
Cyp -115/N	caccatggTTTAAGCTGCTGCTAGCTG	56 ^b	<i>fwd</i>	
Cyp -675/N	tgccatggTGGGCCTGAGTGGTTCTATC	62 ^b	<i>fwd</i>	
Cyp -1.2/N	gtccatggGGGTGGCAACTCACCATTTT	60 ^b	<i>fwd</i>	
Cyp -272/N	gtccatggCTGCTCCCTGTTCTCTGCTC	64 ^b	<i>fwd</i>	
ARE	gatctgAGAACATGATGTTCTga acTCTTGTACTACAAGActctag		<i>ds</i> ^c	
Oatp-RT	TGCGTTGGCTTTAAGGTCTG	57,3	<i>rev</i>	5'-RACE
Oatp-GSP1	CATAACCACCACCAACACC	57,9	<i>rev</i>	
Oatp-GSP2	GCTCCCAGTGATAAATCCAAC	57,9	<i>rev</i>	
Oatp-GSP3	AGGGATACCGAAATGTCTCTC	57,3	<i>rev</i>	
mOatp 10f	GAAACCTTTTGTGATTGTATTCTG	55,9	<i>fwd</i>	RT-PCR
mOatp 6r	CCTATGAGGAATACTGCCTC	57,3	<i>rev</i>	
MJAM RT-GSP	GATGTCCAGGTTACTTGTGTC	58	<i>rev</i>	5'-RACE
MJAM-GSP3	AGCCCCAATAAGCAGCAAG	56,7	<i>rev</i>	
MJAM-GSP4	TGATGTTGGAGAAGCAGG	54	<i>rev</i>	
MJAM GSP3/4	GCACTCAGACACCAGGAAG	60	<i>rev</i>	
MJAM sense 1	GCGCAGAGGAACAAGAAGAAG	60	<i>fwd</i>	RT-PCR
SMJAM 5	GCTTGGGCCTCTCATATTCTC	59,8	<i>rev</i>	
mCypA upp	ATGGTCAACCCCACCGTG	58,2	<i>fwd</i>	RT-PCR
mCypA low	CAGATGGGGTAGGGACG	57,6	<i>rev</i>	

^a En minúscula les dianes de restricció afegides al *primer*; ^b Calculada sense diana; ^c Oligonucleòtid doblecadena.

fwd: forward; *rev*: reverse

Primers addicionals utilitzats en les diferents tasques de seqüenciació dels clons genòmics i de cDNA, però no específicament referits ni citats en el text.

TAULA XIX. Oligonucleòtids II

Gen	Nom		Seqüència (5'-3') ^a	Tm (°C)	Orientació	Comentaris
Cy4b1	CYP4B1	UP	GGTCCTGCGAGTTTAGCCAT	59 °C	fwd	exó# [*] 1
	mCyp4b1	197f	AGATCCAGAAGACAGGAGGCCT	68 °C	fwd	1
	mCyp4b1	290f	TCCTGAACATCTATGAGCCTGA	64 °C	fwd	2
	mCyp4b1	687r	CTGCATCAGCAGTGTGAGGT	62 °C	rev	6
	Cyp4b1	1005f	CTGCATGGCCCTTTATCCTA	60 °C	fwd	8
	Cyp4b1	1140f	GAAGCACTCCTTCATGCACA	60 °C	rev	9
	mCyp4b1	1505f	ATGGCATCCACCTCTACCTG	62 °C	fwd	12
	mCyp4b1	I1f	GGGGGTCTGGACAATATCCT	62 °C	fwd	intró # [*] I - 3'
	mCyp4b1	I2f	TCCCCCATCCATGTAGTGTT	60 °C	fwd	II - 3'
	mCyp4b1	I3f	AGGAGGCTTAGGGAGGCAAG	62 °C	fwd	V - 3'
	mCyp4b1	IVIf	TGACGGCACTTATGCTCTTG	60 °C	fwd	VI - 3'
	Oatp1	SOATP1		CTTGCCCTCCAGTATGCC	55.2 °C	fwd
SOATP-1			GAAGACTGCGGGGAGAAAAG	58.8 °C	rev	
SOATP2			CACAGACCTTAAAGCCAACG	57.3 °C	fwd	
SOATP4			CAGGATAATGTGGATGTGAC	55.3 °C	fwd	
SOATP5			GTGTCCCAACCAAGAATGC	52.6 °C	rev	
SOATP-1REV			CTTTCTCCCCGCAGTCTTC	57.9 °C	fwd	
SOATP-2			CAGGGTTGCACACATGCTAGG	57.1 °C	rev	
OATP-RT			TGCGTTGGCTTTAAGGTCTG	57.3 °C	rev	
OATP-GSP1			CATAACCACACATCCAACACC	57.9 °C	rev	
OATP-GSP2			GCTCCCAGTGATAAATCCAAC	57.9 °C	rev	
SOATP-3			ACCACTGAGTCAGAGG	51.7 °C	rev	
moatp 10f			GAAACCTTTTGTGATTGTATTCTG	55.9 °C	fwd	
moatp 8r			GTTGAGGTCCTTAAAGATGAGG	58.4 °C	rev	
moatp 6r			CCTATGAGGAATACTGCCTC	57.3 °C	rev	
moatp 1720			GATGAGTTTCTCTGATGACCC	57.3 °C	rev	
mOatp1 203r		GAATCTGCCTTCTTGTGTTGC	54.9 °C	rev		
mouse Oatp-d	MJAM 515f		GAGGCAGAAGGCACCGATGTC	62 °C	fwd	
	mjam gal2		CTTCTTCTCGTCCCTCCTGATG	58 °C	fwd	
	MJAM 1399f		CTTCCTCTTCCTGGGCTGTGA	61 °C	fwd	
	smjam 4		GTGCTGAGTTGTTTCCGTAG	57,3 °C	rev	
	MJAM 1692f		CCTTCCTCACCTTCCTCTGT	59 °C	fwd	
	smjam 3		CAGAAGGTGCTCCAGAACAG	59,4 °C	rev	
	MJAM 1990f		GTCCCTTGCCTTCATCCTCT	57 °C	fwd	
rat Oatp-d	rD 125f		AAGGATGCAGGGAAGAAGC	60 °C	fwd	
	rD 397r		AGGTTGCCGATCTCAAAAGCTG	64 °C	rev	
	rD 459r		ACCAGGAAGATCTTGATGTTGGA	65 °C	rev	
	rD 589r		CCATTGGTGGCACAAACAT	56 °C	rev	
	rD 1201f		CTTGCATGGAGATTGCTGTG	60 °C	fwd	
	rD 1420r		GACACCAGGTTGACCAGCAT	62 °C	rev	
	rD 1426f		CCTGCTACGTCTCCTTCCTCT	61 °C	fwd	
	rD 2017r		GCGATGCTGACGTACAGGT	60 °C	rev	
	rD 2466r		ATTCTGAATCCTGACTGGCTCTG	68 °C	rev	

^{*}Posicions d'anclatge dels *primers* en els diferents exons i introns

6. INSTRUMENTACIÓ I APARELLS

Taula annexe amb els noms i models dels principals aparells utilitzats

Categoria	Aparell	Fabricant	Model
Grans Aparells	Autoclau	MATACHANA	
	Màquina de gel	SCOTSMAN	AF20
	Grans Centrífugues	SORVALL	RT6000D
		SORVALL	RC5C
	Criostat	BRIGHT INSTRUMENT COMPANY LTD., UK	
	Reveladora	AGFA	CURIX 60
	Seqüenciador automàtic	PERKIN ELMER	ABI PRISM 310 <i>Molecular analyzer</i>
Congeladors i Neveres	Ultracongeladors (-80°C)	REVCO	
	Nevera/congeldors (-20°C)	LIEBHERR	
Cultius	Campanes de fluxe	TELSTAR	BIO II-A
		TELSTAR	BIO II-B
		TELSTAR	AV-30/70
	Incubadores de CO ₂	FORMA	SCIENTIFIC
	Contenidors de N ₂ (l)	LERY-FRANCE	BR2100 CRYO DIFFUSION
Sistemes de Purificació de H ₂ O	Font d'aigua destil·lada	MILLIPORE	MILLI-RO®
	Font d'aigua bidestil·lada	MILLIPORE	MILLI-Q _{plus}
Sistemes de Buit / Dessecació	<i>Speed-Vac</i>	SAVANT	SC 100
	Assecador de gels	SAVANT	SLAB GEL DRYER SGD 4050
Centrífugues de Sobretaula	Centrífugues refrigerades	HERAEUS	SEPATECH
		EPPENDORF	5415 R
	Microfugues	SIGMA	112
		BECKMAN	MICROFUGUE E™
		HETTICH	EBA 12
Material d'Electroforesi	Cubetes	ECOGEN	(diferents grandàries)
		BIO-RAD	MINI SUB-CELL® CELL GT
		BIO-RAD	SUB-CELL® CELL GT
		LIFE TECHNOLOGIES	s2
	Fonts d'electroforesi	PHARMACIA	LKB-GPS 200/400
		PHARMACIA	EPS 500/400
		BIO-RAD	POWER PAC 300
		CONSORT	E741
Fonts de Calor	Estufes	MEMEMRT	
		HERAEUS (37°C)	
	Banys d'aigua termostatitzats	THERMOMIX MM B. BRAUN	
		AQUA SHAKER	ADOLF KÜHNER AG
	Plaques calefactores / Agitadors magnètics	P SELECTA	TERMOBLOC
		THERMOLINE	NUOVA II STIRPLATE
		HEIDOLF	MR 2002
	Forns d'Hibridació	HYBAID	
		ECOGEN	

Agitadors	<i>shaker</i>	ADOLF KÜHNER AG	
	Agitador Orbital	LUCKHAM	CM100
	Vòrtex	HEIDOLPH	REAX 2000
Microscopia	Microscopis òptics	OLIMPUS	BX40
	Microscopis invertits	LEIKA	
Espectofotòmetres i altres aparells Analítics	Espectofotòmetre UV-VIS	UBIKON	
	Espectofotòmetre UV	PHARMACIA	GENE QUANT II
	Luminòmetre de plaques	LABSYSTEMS	LUMINOSCAN RS
Termocicladors	peltier	MJ RESEARCH INC.	PTC-100
	<i>block</i>	PERKIN ELMER	Geneamp PCR system 2400
		PERKIN ELMER	Ggeneamp PCR system 9600
Varis	Homogeneïtzadors	LITTAU-LUZERN SWISS	POLITRON® KINEMATICA AG

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

MATERIALS

MÈTODES

RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

MÈTODES

1. PURIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEÏCS

1.1. EXTRACCIÓ DE RNA TOTAL

Mètode de Chomzscinki-Sacchi

L'extracció de RNA s'ha realitzat principalment seguint el mètode del tiocianat de guanidini/fenol-cloroform (Chomczynski, P. *et al.*, [280]) amb algunes modificacions. Les quantitats estan ajustades per processar peces de teixit de 200-300 mg –que correspon aproximadament al pes d'un ronyó de ratolí adult– de les quals es recuperen depenent del teixit, entre 400 i 700 μg de RNA total. Per homogeneïtzar els teixits s'ha utilitzat un homogenitzador Politron. *Nota:* les velocitats de centrifugació expresades en *rpm* són vàlides pel rotor SS-34 i la centrifuga SORVALL corresponent.

Reactius:

- Solució D
- Fenol
- Cloroform/alcohol isoamílic 49:1 (v/v)
- Acetat sòdic 2 M, pH 4,0
- Alcohol isopropílic
- Etanol 70% (v/v)

Procediment:

1. Homogenitzar cada teixit en 4 mL de solució D
2. Passar l'homogenat a un tub Corex® de vidre i afegir-hi respectant l'ordre:
 - 400 μL d'acetat sòdic 2 M (pH 4,0);
 - Agitar suaument
 - 4 mL de fenol; Agitar
 - 800 μL de cloroform/alcohol isoamílic 49:1;
 - Agitar amb força
3. Deixar reposar en gel 15 min
4. Centrifugar 30 min a 10.000 *rpm* (4°C); Recuperar la fase aquosa
5. Afegir 5,5 mL d'alcohol isopropílic fred (a -20°C) i agitar vigorosament
6. Incubar-ho a -20°C durant un mínim de 2 h
7. Centrifugar 20 min a 10.000 *rpm* (4°C)
8. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 700 μL de solució D
9. Afegir 700 μL d'alcohol isopropílic fred i agitar amb força
10. Incubar a -20°C durant un període mínim de 60 min
11. Microfugar 15 min a 13.000 g (4°C)
12. Decantar el sobrenedant i rentar el *pellet* de RNA amb Etanol al 70% (v/v)
13. Repetir el pas nº 11
14. Decantar el sobrenedant i deixar assecar breument el *pellet*
15. Resuspendre el RNA en H₂O-DEPC (entre 100-200 μL) i valorar la concentració resultant a l'espectrofotòmetre (llegir a 260 nm).

Un cop obtingut, el RNA s'emmagatzema a -80°C fins a la seva posterior utilització.

Extracció de RNA amb el kit RNeasy de QIAGEN

A part del mètode clàssic de Chomczynski, també s'ha utilitzat l'equip per extreure RNA total de la casa comercial QIAGEN, sobretot a partir de teixit i també de cèl·lules. El *kit*, basat en la utilització de columnetes cromatogràfiques d'afinitat –enlloc de substàncies potencialment tòxiques com el fenol i el cloroform–, suposa un

estalvi important de temps respecte al mètode anterior citat, permetent a més processar en paral·lel un nombre superior de mostres, sense cap minva en la reproducibilitat. Essencialment s'han seguit les recomanacions subministrades pel fabricant. En el cas de teixits, s'ha partit de 300 mg per columneta, mentre que quan el material d'origen foren cèl·lules, es processà una placa confluent de 10 mm de diàmetre. La qualitat i la puresa del RNA obtingut és suficient per a poder utilitzar aquest RNA en aplicacions com *northern-blot* o RT-PCR.

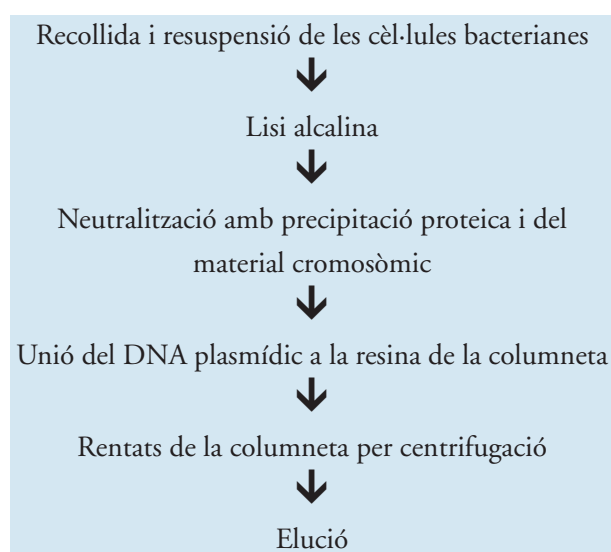
1.2. EXTRACCIÓ DE RNA POLI (A)⁺

La gran fracció majoritària del RNA total consisteix en RNAs ribosomals, dels quals és interessant despendre's per realitzar determinades aplicacions. El component de RNA missatger constitueix tot just el 2% del total. Per a l'obtenció de la fracció poli(A)⁺ –corresponent al RNA missatger– a partir de RNA total, s'ha fet servir l'equip i les prescripcions del *QuickPrep[®] Micro mRNA Purification Kit*. [PHARMACIA], basat en l'ús d'un polímer conjugat amb oligo(dT) que uneix específicament la cua poli(A)⁺ dels missatgers de RNA. S'ha partit inicialment de 300 µg de RNA total, obtenint-se al final del procés de 5-10 µg de mRNA poliadenilat, de prou puresa per a utilitzar-se com a motlle en reaccions de transcripció inversa o d'altres manipulacions enzimàtiques.

1.3. PURIFICACIÓ DE DNA PLASMÍDIC

Purificació a petita escala de DNA plasmídic (*Miniprep*)

Per a la preparació de plasmidi a partir de cultiu bacterià d' *E. coli*, s'ha utilitzat el *kit* comercial *Wizard[®] plus SV Minipreps Purification System* de Promega. Amb aquest *kit*, basat en el mètode de la lisi alcalina i adsorció del DNA a una resina especial, s'aconsegueixen unes mostres de DNA plasmídic de puresa suficient per a ser utilitzades directament en reaccions de seqüenciació automàtica fluorescent o en digestions enzimàtiques. S'han processat volums de 3-5 mL de cultiu, obtenint-se rendiments totals d'entre 15-20 µg de DNA (en el cas de que el plasmidi fos d'alt nombre de còpies). S'ha seguit el protocol estàndard subministrat amb el *kit*, els passos principals del qual es resumeixen a continuació:



Purificació a gran escala de DNA plasmídic (*Maxiprep*)

En els casos en els quals el requeriment de DNA és considerable, com són per exemple digestions preparatives o transfeccions, entre d'altres, s'ha procedit a purificar els plasmidis recombinants a partir de volums superiors de cultiu bacterià d' *E. coli* en format *Maxiprep*.

Hom s'ha servit principalment al llarg de la tesi de dos *kits* comercials diferents:

- el *Plasmid Maxi kit* de QIAGEN
- el *Nucleobond® AX 500* de MACHERY-NAGEL

Al principi del treball experimental que ens ocupa s'utilitzà majoritàriament l'equip de QIAGEN, mentre que posteriorment es passà a utilitzar preferentment les columnetes i material del segon *kit*, sobretot degut a la millora obtinguda en l'eficiència de les transfeccions utilitzant el DNA purificat amb el mateix.

1.4. PURIFICACIÓ DE DNA DEL BACTERIÒFAG λ

Preparació a petita escala de DNA de bacteriòfag λ (*lambda-miniprep*)

Per preparar quantitats no gaire grans de DNA del fag λ , suficients per realitzar algunes digestions diagnòstiques o alguna carrera de seqüència, s'ha utilitzat el *kit* comercial *Wizard® Lambda Preps DNA Purification System* de PROMEGA. El sistema ofereix una forma ràpida i abordable de purificació del lambda-DNA a partir de lisats de cultius líquids o lisats en placa. El procediment sencer es pot completar en poc més d'una hora i mitja, i es basa en l'ús d'una resina d'unió al DNA, tot plegat adaptat al format 'columneta' compatible amb la utilització de microcentrifuga. S'han seguit essencialment les instruccions subministrades pel fabricant, obtenint uns rendiments de 6-10 μg de DNA (a partir de 10 mL de lisat) .

Preparació a gran escala de DNA del bacteriòfag λ (*lambda-maxiprep*)

En els casos en que es requereixi grans quantitats de DNA de fag lambda com per exemple seqüenciació exhaustiva o per subclonatge, caldrà realitzar purificacions grans per obtenir suficients micrograms de DNA per poder treballar. A tal efecte s'ha emprat el *Lambda maxi kit* de la casa comercial QIAGEN. Normalment els lisats de fag s'han realitzat en placa, a partir de la infecció de 20 plaques bacterianes de 90 mm (o de 10 plaques de 140 mm), obtenint de 100-150 mL de lisat d'elevat títol (1×10^7 - 1×10^8 pfu/mL), assolint-se recuperacions de fins a 150-200 μg de DNA bacteriofàgic.

Reactius:

- | | |
|--------------------------|-----------------------------------|
| • Plaques NZY-bottom | • Medi LB |
| • Top agar | • Tampó SM |
| • Maltosa al 20 % (w/v) | • Cloroform |
| • MgSO_4 100 mM | • Kit λ maxiprep (QIAGEN) |

Procediment:

PREPARACIÓ DE LES CÈL·LULES HOST, PROPAGACIÓ DELS FAGS I PREPARACIÓ DELS LISATS (EN PLACA)

- | | |
|---|--|
| 1. El dia previ, posar un cultiu de nit d' <i>E.coli</i> XL1-Blue MRA, per inoculació –amb una colònia aïllada– de 5 mL de LB (suplementat amb 50 μL de maltosa al 20% (w/v) i 500 μL de MgSO_4 100 mM). Agitar o/n a 37°C (a 200-225 rpm) | 2. Per cada placa de 90 mm, prendre 200 μL del cultiu de nit anterior fresc, i infectar-lo a alta multiplicitat amb els fags λ recombinants (amb 1×10^5 - 1×10^6 pfu totals, <i>i.e.</i> aproximadament 10-50 μL de lisat concentrat de bacteriòfag) |
|---|--|

3. Incubar 15 min a 37°C amb agitació molt suau
4. Afegir 3 mL de “top-agar” fos a 45-50°C sobre la barreja de bacteris/fags, barrejar breument i abocar-ho sobre una placa de “NZY-bottom agar”, de manera que s’escampi per tota la superfície
5. Quan el “top-agar” s’hagi endurit suficientment (de 5-10 min), invertir les plaques i incubar-les a l’estufa de 37°C de 6-12 h o fins que s’hagi produït una lisis completa i confluent

Elució dels fags

6. Un cop les plaques estan lisades, recuperar els fags afegint-hi 3-4 mL de tampó SM / placa de 90 mm
7. Mantenir-les amb agitació constant durant 3-4 h a temperatura ambient per tal d’eluir-ne els fags
8. Recollir els eluïts de les plaques, esbandir-les amb 1 mL més d’SM i ajuntar-lo amb la resta de volum de lisat. Afegir-hi cloroform fins al 2 % (v/v), vortexar vigorosament
9. Centrifugar durant 10 min a 13.000 rpm per tal d’eliminar l’agarosa residual i el debris bacterià, conservant el sobrenedant resultant a 4°C

PURIFICACIÓ DELS FAGS (MAXIPREP)

S’ha seguit el protocol del fabricant, utilitzant-se els tampons i les columnetes subministrades amb el *kit*. En general s’ha partit de 100-150 mL de lisat en placa (obtingut a partir de l’infecció d’unes 20 plaques de 90 mm).

Esquemàticament és el següent: (*figura 34*).

10. Afegir 400 µL de tampó L1* per cada 250 mL de lisat; incubar 30 min a 37°C
11. Afegir 50 mL de tampó L2* fred (0°C) i barrejar suaument; incubar 60 min en gel
12. Centrifugar a >10.000g durant 10 min, descartar el sobrenedant
13. Resuspendre extensivament el *pellet* en 9 mL de tampó L3*
14. Afegir 9 mL de tampó L4* i barrejar suaument; incubar 20 min a 70°C, llavors refredar en gel
15. Afegir 9 mL de tampó L5* i barrejar immediatament per inversió
16. Centrifugar 30 min a >15.000 g (4°C); transferir

el sobrenedant a un tub fresc

17. Centrifugar un altre cop 10 min a >15.000 g (4°C); reservar el sobrenedant obtingut
18. Equilibrar la columna QIAGEN-500 amb 10 mL de tampó QBT*, deixar budar la columneta per gravetat
19. Aplicar el sobrenedant del pas nº17 dins la columna i deixar que flueix-hi per gravetat

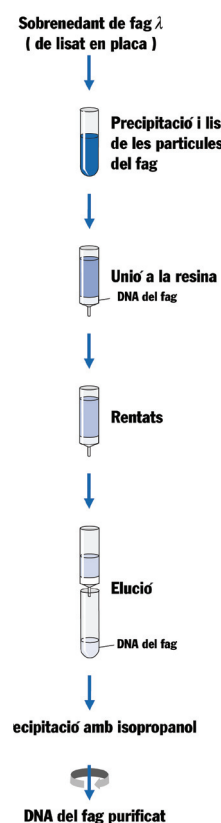


FIG 34. Procés esquemàtic de purificació dels fags

20. Rentar la columna amb 30 mL de tampó QC*
21. Eluir la columna amb 15 mL de tampó QF*
22. Precipitar el DNA eluït amb 10,5 mL d’isopropanol (a temp. ambient); barrejar
23. Centrifugar 30 min a >15.000g (4°C) decantar acuradament el sobrenedant sense alterar el *pellet*
24. Rentar amb 5 mL d’etanol 70% (a temp. ambient)
25. Repetir el pas nº23
26. Deixar assecar el *pellet* de DNA 5-10 min a l’aire; redossoldre’l amb un volum adequat de tampó TE, pH 8,0.

*Subministrats amb el kit

1.5. EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC

El DNA genòmic s'ha obtingut a partir de fetge de ratolí mitjançant un protocol adaptat a partir de varis mètodes estàndars d'aïllament de DNA d'alt pes molecular, basats essencialment en la digestió del teixit amb proteïnasa K i extracció per fenolització. Per aconseguir la màxima integritat del genòmic és recomanable partir de teixit fresc (alternativament, es pot partir de teixit congelat, amb la consegüent davallada en la qualitat del genòmic obtingut); s'obtenen aproximadament de 50-200 μg de DNA per cada 100 mg de teixit. Tot el procés es realitzarà en condicions de màxima netedat per tal d'evitar la contaminació del DNA genòmic amb DNases.

Reactius:

- Solució de digestió (SDS 0,5%, EDTA 100 mM, Tris·Cl 50 mM, pH 8,0) top agar
- *Proteïnasa K* a 10 mg/mL [ROCHE]
- *Ribonucleasa A* a 10 $\mu\text{g/mL}$ [ROCHE]
- Fenol [MERCK]
- Fenol/cloroform 1:1 (v/v)
- Cloroform/alcohol isoamílic 24:1 (v/v)
- Acetat sòdic 3 M (pH 6,0)
- Alcohol etílic
- Tampó TE (EDTA 1mM, Tris·Cl 10 mM, pH 8,0)

Procediment:

1. Extreure i tallar la peça de fetge en trocets d'aproximadament 100 mg. Posar cadascun d'aquests fragments trossets dins de tubs *ependorf* estèril. Afegir-hi 700 μL de solució de digestió
2. Afegir a cada tub 35 μL de *proteïnasa K* a 10 mg/mL
3. Incubar els tubs a 55°C overnight amb agitació eventual
4. Al dia següent, afegir 20 μL de *RNasa A* a 10 $\mu\text{g/mL}$ i incubar 1 h extra més ara a 37°C
5. Centrifugar breument els tubs per tal de sedimentar els restes de teixit no digerits; transferir el sobrenedant viscos (~500 μL) a un nou tub *ependorf*
6. Afegir 700 μL de fenol (equilibrat amb tris pH 8,0) als tubs; tapar i agitar per inversió durant 5 min
7. Centrifugar 5 min en una microfuga a 13.000rpm per tal de separar les 2 fases
8. Transferir la fase aquosa a un nou tub, tot procurant de no arrossegar gaire interfase proteínica
9. Afegir als tubs 700 μL de fenol/cloroform 1:1 (v/v) i agitar per inversió durant 5 min a temperatura ambient; repetir el pas nº7
11. Transferir la fase aquosa, sense gens d' interfase, a un tub fresc
12. Afegir 700 μL de cloroform/isoamil alcohol (24:1), agitar per inversió 5 min
13. Repetir el pas nº7; Recuperar la fase aquosa (evitant d'agafar interfase) i traspasar-la a un nou tub
14. Afegir 70 μL de acetat sòdic 3M (pH 6,0); remenar
15. Afegir al tub 700 μL de alcohol etílic a temperatura ambient, per tal de precipitar el DNA genòmic
16. Centrifugar 5 min a màxima velocitat; descartar el sobrenedant
17. Rentar el *pellet* de DNA amb 1 mL d'etanol al 70% (v/v)
18. Centrifugar 5 min a vel. màx.; descartar el sobrenedant
19. Repetir els passos nº16 i 17
20. Deixar assecar breument el DNA genòmic
21. Resuspendre i dissoldre el genòmic en 100 μL de tampó TE, deixar ressupenent tota la nit a la cambra freda amb agitació suau. Un cop dissolt completament, conservar-lo a 4°C.

El DNA genòmic preparat d'aquesta forma té la suficient puresa per a ser digerit amb enzims de

restricció o per a ser utilitzat com a motlle per PCR.

1.6. PURIFICACIÓ DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA

Els fragments de DNA resolts electroforèticament en gels d'agarosa poden ser recuperats i purificats a partir del gel, per a poder ser utilitzats en aplicacions posteriors. En primer lloc, es duu a terme l'electroforesi preparativa amb els DNA's d'interès en un gel d'agarosa-EtBr. Un cop separats els fragments, es retalla la banda o bandes a recuperar amb una fulla estèril de bisturí, sota il·luminació ultraviolada de baixa energia per poder visualitzar el DNA. Es pesa la banda d'agarosa escindida i es procedeix a purificar-ne el DNA contingut. Per aquesta fi, s'ha utilitzat el *Agarose gel DNA extraction kit* de ROCHE, basat en la utilització de pols de sílica que reté adsorvit el DNA en presència de sals caotrópiques, permetent de realitzar els rentats per endur-se les impureses, fins al pas final d'elució. S'ha seguit bàsicament el protocol suggerit pel fabricant amb alguna petita modificació.

Procediment:

1. Realitzar l'electroforesi preparativa
2. Retallar el DNA en el mínim bloc d'agarosa possible, i transferir-lo a un tub eppendorf estèril
3. Pesar el tub (prèviament tarat); si cal, repartir la banda en varis tubs per tal de que no sobrepassin els ~2 mg per tub
4. Afegir-hi 300 μL de solubilization buffer per cada 100 mg d'agarosa
5. Resuspendre la matriu de sílica fins aconseguir una suspensió homogènia. afegir 13 μL de la mateixa al tub anterior (per bandes amb < 2,5 μg de DNA, alternativament afegir-hi 5,5 μL de sílica/ μg de DNA)
6. Posar el tub fortament tapat en un bany a 56°C durant 10 min, per tal de desfer l'agarosa i d'unir el DNA a la sílica; vortexar breument el tub cada 2-3 min al llarg de la incubació
7. Centrifugar 30s a la màxima velocitat per sedimentar la sílica-DNA; descartar el sobrenedant tot procurant de no perdre gens de pellet
8. Afegir 500 μL de binding buffer i vortexar lleument; tornar a centrifugar com en el pas anterior
9. Rentar la matriu de sílica amb 500 μL de washing buffer; repetir el pas nº 7
10. Repetir el rentat anterior; aspirar el sobrenedant resultant amb una pipeta pasteur estirada, amb cura de no emportar-se sílica
11. Deixar assecar la matriu de sílica a l'aire sobre paper absorbent durant 10 min
12. Elució: afegir 30 μL de tampó d'elució (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0) al tub i incubar-lo 10 min a 56°C; vortexar vigorosament cada 2-3min per afavorir l'elució del DNA
13. Centrifugar 3 min a la màxima velocitat. Recuperar el sobrenedant que conté el DNA purificat, i transferir-lo a un nou tub estèril
14. Centrifugar 30 s el tub per tal de sedimentar les possibles impureses de sílica que s'hagin pogut arrossegar en el pas anterior. Transferir el sobrenedant finalment a un nou tub eppendorf estèril; Guardar el DNA purificat a 4°C o a -20°C, segons el temps d'utilització.

Amb aquest protocol s'obtenen uns rendiments de recuperació moderats del 50-70%; en el cas de que el DNA de partida sigui escàs i valuós, per millorar la quantitat total recuperada, es pot reeluir la sílica obtinguda en el pas nº13, ajuntant els dos eluits successius en un sol tub. Com a inconvenient tindrem que el DNA estarà més diluït, amb el que segons per a quina aplicació caldrà concentrar-lo, per exemple fent ús del *speed-vac*.

1.7. PURIFICACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR O RT-PCR

Per netejar els productes d'amplificació obtinguts en les PCR de sals, primers i altres components indesitjables, s'han utilitzat al llarg de la tesi dos kits comercials de neteja, un de QIAGEN (*QIAquick PCR purification kit*) i l'altre de ROCHE (*High Pure™ PCR product purification kit*), ambdós basats amb l'ús de columnetes amb un polímer que reté el DNA en determinades condicions i que es poden adaptar a la microcentrífuga per fer els rentats i elucions. Amb aquests dos sistemes es poden purificar fragments amplificats de DNA entre 0,1-10 kb de grandària. S'han seguit les indicacions subministrades pels fabricants, eluint finalment el DNA en un volum de 30-50 µL de tampó Tris·Cl 10 mM, pH 8,0 per tal d'obtenir la major concentració possible.

El procediment (amb columnetes ROCHE) és el següent, breument:

1. Portar les reaccions de PCR fins a un volum total de 100 µL amb H₂O destil·lada
2. Afegir a cada tub 500 µL de *binding buffer** i barrejar bé
3. Transferir la barreja anterior dins d'una columneta de neteja –introduïda prèviament dins un tub col·lector
4. Centrifugar 30 s a màxima velocitat (en una microfuga); descartar l'eluit
5. Afegir 500 µL de tampó de rentat* a cada columneta
6. Repetir el pas nº4
7. Afegir 250 µL de tampó de rentat*; centrifugar com en el pas nº4
8. Transferir les columnetes a tubs nous
9. Eluir amb 30-50 µL de tampó d'elució*; centrifugar 45 s a màxima velocitat; recuperar el DNA eluit del fons del tub.

*Subministrats amb el kit.

2. ANÀLISI D'ÀCIDS NUCLEÏCS

2.1. ELECTROFORESI EN GELS D'AGAROSA

El material d'electroforesi utilitzat han estat principalment cubetes tipus “minigel” i mitjà, de les cases ECOGEN i BIO-RAD; les fonts d'electroforesi, de HOEFFER i BIO-RAD.

Pels gels de formaldehid, s'ha utilitzat una cubeta mitjana reservada exclusivament per treballar amb RNA, i manipulada en les condicions més lliures de RNases possible.

Electroforesi analítica

Per analitzar electroforèticament el resultat de les digestions de DNA plasmídic i/o altres mostres d'àcids nucleics amb caràcter diagnòstic, normalment s'han utilitzat gels petits d'agarosa [*agarosa estándar grado medio*, ECOGEN] preparats en tampó TAE 1x. El percentage d'agarosa dels gels oscil·la entre 0,7-2% (w/v) segons la grandària dels productes a separar. El bromur d'etidi s'incorpora directament en el gel (per poder visualitzar el DNA al transiluminador) a una concentració final de $\sim 0,5 \mu\text{g/mL}$.

Electroforesi preparativa

En el cas de voler recuperar DNA a partir de gels d'agarosa per aplicacions posteriors s'ha utilitzat gels preparats amb agarosa de la màxima puresa [molecular biology grade agarose, PROMEGA], treballant amb dimensions i volums de càrrega més grans (50-100 μL en pous grans). Per separar òptimament els fragments a ressoldre, es corre el gel lentament durant períodes llargs (sovint o/n a 20-40 V).

En ambdues electroforesis, les mostres a carregar s'han preparat diluint-les 1/10 en tampó de càrrega (tampó de càrrega 10x: 50% Glicerol, 0,21% Blau de bromofenol, 0,21% *Xylene cyanol FF* i 0,2M EDTA pH 8,0).

2.2. MARCATGE RADIOACTIU DE SONDES DE DNA

En les diferents tècniques basades en l'hibridació entre àcids nucleics de cadena complementaria, com el *Southern-blot*, el *northern-blot* i el mateix *screening* de genoteques, cal marcar els fragments de DNA que posteriorment es detectaran específicament. Tot i que existeixen mètodes i protocols no radioactius basats en l'ús d'anticossos i detecció amb substrats quimioluminiscent, els mètodes de marcatge radioactius ofereixen una sensibilitat de detecció més alta.

Segons el cas, s'ha utilitzat principalment sondes de DNA de cadena doble (superiors a 100 *pb* de llargària) i en algunes ocasions també oligonucleòtids curts de cadena sencilla. En el cas del marcatge d'oligonucleòtids (15-25 *nt* de llargària) s'ha utilitzat l'enzim polinucleòtid quinasa, que catalitza la transferència d'un grup fosfat des de la molècula d'ATP a l'hidroxil lliure de l'extrem 5' de l'oligo, incorporant-hi així l'àtom radioactiu de fosfor-32 de l'ATP; pel marcatge de molècules de DNA de cadena doble, s'ha utilitzat el mètode d'inciació aleatòria o “random priming”, en el qual mitjançant el fragment *klenow* de l'enzim DNA polimerasa s'inicia la síntesi de DNA des de múltiples punts, originats per l'hibridació inespecífica de *primers* de seqüència aleatòria, en condicions de baixa astringència. Aquesta tècnica aconsegueix unes activitats específiques de marcatge molt altes, amb l'asequibilitat de poder-se realitzar tot el procés en menys d'una hora. Els nucleòtids radioactius no incorporats s'eliminen –un cop realitzat el marcatge–, amb columnetes d'exclusió molecular de *Sephadex* (de format adaptat a la microcentrifuga).

Marcatge d'oligonucleòtids en 5'**Reactius:**

- Polinucleòtid quinasa (PNK) del fag T4 [PROMEGA]
- Microcolumnetes *ProbeQuant*TM G-25 [AMERSHAMPHARMACIA]
- [γ -³²P]ATP (a 3000Ci/mmol, 10mCi/mL) [AMERSHAMPHARMACIA]

Procediment:

1. En un tub eppendorf amb tap de rosca, muntar la següent reacció de marcatge:

Quantitat	Component
2 μ L	H ₂ O <i>milliQ</i>
1 μ L	10x <i>kinase buffer</i>
1 μ L	oligonucleòtid a 10 μ M (1 pmol total)
1 μ L	T4 PNK a 10 U/ μ L
5 μ L	[γ - ³² P]ATP
2. Incubar a 37°C durant 30 min
3. Purificar la reacció passant-la per una microcolumneta G-25 (s'han seguit les indicacions del fabricant*)
4. Determinar amb el comptador de centelleig, l'activitat específica incorporada a la sonda
5. Reservar a 4°C fins a la seva utilització (normalment, en el mateix dia).

Marcatge de sondes per random priming

S'ha utilitzat el kit de marcatge *Random primer DNA Labeling kit*, de la casa comercial BIOLOGICAL INDUSTRIES, que conté una única barreja de marcatge preparada en el *buffer* adequat per utilitzar-se -composada per l'enzim, els primers aleatoris, els desoxinucleòtids (dATP, dGTP, dTTP). Amb aquest senzill kit de marcatge, es poden assolir activitats específiques de fins a 2x10⁹ dpm/ μ g després de només 10 min d'incubació.

En tots els casos, com a motlle s'ha partit de 25 ng de DNA doblecadena purificat, seguint-se els consells del proveïdor del *kit* de marcatge, resumidament:

Reactius

- Kit de marcatge [BIOLOGICAL INDUSTRIES]
- [α -³²P]dCTP (a 300 Ci/mmol) [AMERSHAMPHARMACIA]
- Columnetes *Microspin* G-50 [AMERSHAMPHARMACIA]

Procediment

1. Desnaturalitzar el DNA motlle (25 ng) bullint-lo 5 min a 100°C, tot seguit refredar en gel
2. Muntar la reacció de marcatge, partint del DNA anterior, i utilitzant [α -³²P]dCTP com a radionucleòtid
2. Incubar de 10-20 min
3. Purificar la reacció dels nucleòtids no incorporats per centrifugació mitjançant una columneta G-50
- (seguint el protocol del fabricant*).
- En alguns casos, la sonda es va purificar per precipitació amb etanol.
4. Determinar l'activitat de la sonda al comptador de centelleig[†] (s'han obtingut normalment de 5x10⁷-1x10⁸ cpm totals / reacció)
5. Reservar la sonda a 4°C fins a la seva utilització (sovint el mateix dia).

**Breument*: empaquetar la columneta centrifugant 1 min a 3750 rpm, aplicar la mostra i centrifugar 2 min; conservar l'elut.

[†]Pel càlcul de l'activitat específica, utilitzar la fórmula aproximada següent:

$$\text{Activ. Espec.} = \frac{\text{cpm} / \mu\text{L}}{\text{ng DNA}}$$

2.3 ANÀLISI DE DNA

2.3.1. SOUTHERN-BLOT

La transferència de fragments de restricció de DNA des de gels d'agarosa a membranes, i posterior hibridació amb sondes radioactives (marcades amb ^{32}P), és una tècnica essencial dins la biologia molecular. El DNA digerit pot tractar-se de DNA genòmic, plasmídic (en el nostre cas), de fag, de BAC, etc. Primer es separarà en funció de la seva grandària mitjançant electroforesi en un gel d'agarosa. Seguidament es desnatura el DNA en el si del gel, sucant-lo en una solució alcalina, neutralitzant-lo a continuació en tampó Tris. El DNA és transferit llavors per capil·laritat en presència de sals a un filtre de nitrocelulosa o de nylon, on queda adsorvit. Finalment és fixat covalentment al filtre, i es guarda sec fins que s'hagi d'hibridar. Les membranes que hem utilitzat han estat filtres de Nylon [Zeta-Probe, BIO-RAD], que ofereixen una millor sensibilitat, resistència a repetides deshibridacions i menor *background*.

S'han provat varies solucions i diferents condicions d'hibridació, seguint al final les instruccions suggerides pel proveïdor de les membranes de Nylon, havent funcionat millor la basada en SDS (com a agent bloquejant) i formamida.

Breument el protocol és:

Reactius:

- HCl 0,25 M
- NaOH 0,5 M/NaCl 1 M
- Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4/NaCl 3 M
- SSC 20x
- SDS 20 % (w/v)
- NaCl 4 M
- Na_2HPO_4 pH 7,4
- Formamida desionitzada

Procediment:

Digestió del i electroforesi del DNA

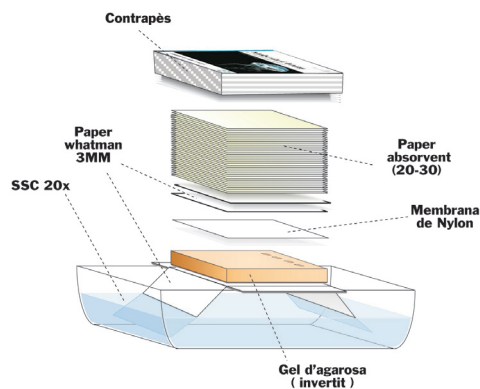
1. Digerir el DNA (1-5 μg per DNA plasmídic i 10 μg per DNA genòmic) amb els enzims de restricció adequats
2. Resoldre electroforèticament les mostres en un gel d'agarosa a voltatge constant de 65 V, fins que els fragments s'hagin separat adequadament
3. Un cop s'ha corregut el gel, si no és que ja portava bromur d'etidi, es pot tenyir per tal de fotografiar-lo al transiluminador (sota llum ultraviolada de longitud d'ona llarga)

Transferència

4. Depuració: Transferir el gel a una safata Pyrex que contingui una solució de HCl 0,25 M. Agitar suaument durant 10 min. esbandir el gel breument amb H_2O destil·lada.
5. Desnaturalització: Submergir el gel durant 20 min amb agitació, en una safata plena de tampó desnaturalitzant, *i. e.* NaOH 0,5 M/NaCl 1 M. Incloure al final un bany amb H_2O destil·lada,

abans de passar-lo a la següent solució

6. Neutralització: Neutralitzar el gel per immersió en Tris-HCl 0,5M, pH 7,4/NaCl 3M. Deixar-lo equilibrant durant 30 min amb agitació suau
7. Realitzar el muntatge de la transferència. S'utilitzen membranes de nylon carregades positivament, per tal d'assolir la màxima capacitat d'unió de DNA. El muntatge realitzat consisteix en el següent:



8. Es deixa transferint 12-16 h (o/n)

9. Dismuntar la transferència i fixar el DNA a la membrana amb radiació UV (mitjançant un aparell *crosslinker*, [STRATAGENE])

10. Guardar les membranes seques entre dos papers WHATMAN, fins la seva utilització

Protocol d'Hibridació

11. Posar la membrana en un tub cilíndric de vidre, amb un petit volum de solució de pre-hibridació (15-20 mL si es un tub gran i 10-15 mL si es un de petit). Solució de prehibridació/hibridació:

SDS 7% (w/v)
Na₂HPO₄, pH 7,2
NaCl 0,25 M
Formamida 50% (v/v)

12. Pre-hibridar en un forn d'hibridació a 42°C un mínim de 5 min

13. Mentrestant, desnaturalitzar 5 min a 100°C la sonda marcada radioactivament, clavar en gel i afegir-la al tub d'hibridació. S'utilitzen 1-2x10⁶ cpm/mL

14. Hibridar o/n a 42°C

15. Realitzar els següents rentats de la membrana en volums abundants de solució de rentat:

i) quatre rentats de 5-10 min amb SSC 2x/SDS 0,1% (RT)

ii) un rentat de 15 min amb SSC 0,5x/SDS 0,1% (RT)

iii) un rentat de 30 min amb SSC 0,1x/SDS 0,1% (65°C)

16. Finalment, exposar els filtres hibridats amb pel·lícules autoradiogràfiques (*hyperfilm*, AMERSHAM) en cassettes de raigs-X, a -70°C.

2.3.2. PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)

L'amplificació de DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), s'ha erigit com un procediment bàsic al laboratori de biologia molecular. En aquesta tesi, s'ha utilitzat directament en nombroses ocasions tan a nivell diagnòstic com a nivell preparatiu, així com a tècnica constituent d'alguna de les etapes d'altres metodologies com el 5'-RACE o en els reaccions de seqüenciació fluorescent. Cada problema concret a resoldre a través de la PCR requereix una optimització individualitzada de la reacció d'amplificació. Independentment del disseny adequat dels primers per cada gen o situació, la temperatura de *annealing* (T_m), el número de cicles o la concentració de reactius com el Mg²⁺ han estat factors a tenir en compte.

A nivell de reactius, existeixen molts productes comercials basats en diferents formulacions de barreges de reacció i de polimerases termostables, amb diferents propietats. Com a enzim "de batalla" s'ha utilitzat principalment la *Ecotaq* de la casa ECOGEN, mentre que per aplicacions més delicades o especialitzades (com el clonatge per pcr, o en casos de minimització dels errors) s'ha optat per polimerases com la *FastStart* de ROCHE o la *Pfu turbo* de STRATAGENE. Per reaccions d'amplificació de productes grans, la *high expand* de ROCHE o la *LA Taq* de TAKARA han ofert resultats satisfactoris.

En referència als aparells utilitzats, s'ha disposat majoritàriament dels termocicladors geneamp 2400 de PERKIN ELMER i el *PCT-100™ Programmable Thermal controller*, de MJ RESEARCH; els casos de moltes reaccions en paral·lel, l'escollit ha estat el genamp 9600 de PERKIN ELMER, dotat d'un *block* que pot acomodar 96 tubs.

Donat que cada fabricant recomana unes determinades condicions per la PCR, hem optat per oferir a continuació un protocol estàndard, vàlid en la majoria de casos com a punt de partida (sense oblidar que caldrà sovint una optimització de les condicions esmentades)

Reactius

- Enzim: *Taq* polimerasa o afins, amb el seu tampó corresponent
- MgCl₂ a 50 mM
- dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, equimolars a 10 μM)

- Tubets de PCR de paret fina
- primers 'forward' i 'reverse' a 10 pmol/ μ L
- H₂O estèril

Procediment

1. Disposar la reacció següent en gel: V_{final} 50 μ L

Component	Concentració
H ₂ O destil·lada estèril	fins al V final
DNA motlle [†]	
10x Taq buffer [*]	1x
MgCl ₂ 50 mM	[1,5 mM final]
dNTP mix 2,5 mM	[200 μ M final]
forward primer 10 μ M	[1 μ M final]
reverse primer 10 μ M	[1 μ M final]
EcoTaq	(1-2,5 U totals)

*Subministrat amb la DNA polimerasa específica utilitzada.

[†]Les quantitats aproximades de DNA motlle varien segons s'hagi tractat de DNA genòmic, DNA plasmídic o cDNA. En general un punt de partida pot ser 25-100ng de genòmic, i 0,1-1ng de plasmídic.

2. Tapar de manera ferma els tubs i col·locar-los a

l'interior del termociclador amb el *block* preescalfat a la temperatura inicial del programa (94°C o la que sigui)

3. Executar el programa de PCR.
(programa tipus:)

1)	94°C	5min
2)	94°C	30 s
3)	T_a^s °C	30 s
4)	72°C	1min/kb
5)	Repetir 35 vegades els passos 2-4	
6)	72°C	5 min
7)	4°C	∞

^sTemperatura d'anellament, sovint $\sim$ 5°C per sota de la T_m dels primers

2.3.3. SEQÜENCIACIÓ DE DNA

La majoria de les seqüències fluorescents han estat realitzades per part del servei intern de seqüenciació del centre. Per fer les reaccions s'han utilitzat els ABI PRISM dRhodamine Terminator cycle sequencing cycle ready, i el Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction kits de PERKIN ELMER/APPLIED BIOSYSTEMS, analitzant-les en un seqüenciador automàtic ABI PRISM 310 genetic analyser [PERKIN ELMER BIOSYSTEMS].

En situacions concretes com les de la tècnica del primer extension, que requereix l'ús de seqüenciació manual, s'han dut a terme doncs seqüències manuals radioactives, basades en el mètode de terminació pels didesoxinucleotids descrit per Sanger, F. i col·laboradors [281]. En aquests casos, s'ha utilitzat l'enzim i el kit thermosequenaseTM subministrat per USB, amb algunes modificacions sobre el protocol indicat pel fabricant.

Seqüenciació automàtica

Les reaccions de seqüència s'han realitzat mitjançant l'ajut d'un termociclador; les condicions descrites a continuació estan optimitzades per l'aparell PERKIN ELMER GeneAmp PCR System 2400.

Reactius:

- Big dye [APPLIED BIOSYSTEMS]
- TSR polymer [APPLIED BIOSYSTEMS])
- Etanol
- Columnetes autoseq G-50 [PHARMACIA]
- H₂O destil·lada estèril
- Primer per seqüenciar a 5 μ M

Procediment

SEQÜENCIACIÓ DE DNA PLASMÍDIC i/o PRODUCTES DE PCR

1. Muntar les reaccions de seqüència següent:

V_{final} 20 μ L	Quantitat	Component
	Fins a 20 μ L	H ₂ O estèril
	X μ L	motlle de DNA [†]
	1 μ L	<i>primer</i> 5 μ M
	4 μ L	<i>Big Dye</i>

[†]Utilitzar les quantitats següents: Producte de PCR, 200 ng ; Plasmidis, 0,9-1 μ g.

2. Programar i executar al termociclador el següent programa:

1)	96°C	2 min
2)	96°C	10 s
3)	T_a^* °C	5 s
4)	60°C	4 min
5)	Repetir 25 cops els passos 2-4	
6)	4°C	∞

*Temperatura d'*annealing* del *primer* (ajustar a $\sim$ 5°C per sota de la T_m del *primer* usat per seqüenciar).

3. Precipitació de les seqüències, afegir als tubs:

16 μ L	de H ₂ O destil·lada
64 μ L	d'Etanol al 95%

4. Vortexar, deixar precipitant 15 min a temperatura ambient
5. Centrifugar 20 min a 14.000 rpm
6. Rentar el *pellet* amb 250 μ L d'etanol al 70%
7. Assecar
8. Guardar el *pellet* sec (protegit de la llum) a 4°C fins a la seva posterior preparació per punxar la mostra:
 - i) Resuspendre'l bé en 15 μ L de TSR
 - ii) Fer un *spin* breu
 - iii) Desnaturalitzar 3 min a 94°C
 - iv) Centrifugar breument i clavar en gel
 - v) Guardar a 4°C a les fosques.

SEQÜENCIACIÓ DE DNA DE FAG

1. Muntar la reacció de seqüència següent:

V_{final} 40 μ L	Quantitat	Component
	Fins a 40 μ L	H ₂ O estèril
	X μ L	motlle de DNA bacteriofàgic [†]
	2 μ L	<i>primer</i> 10 μ M
	14 μ L	<i>Big Dye</i>

[†]Utilitzar com a motlle $\sim$ 1,5 μ g de DNA de fàg

2. Programar i executar el següent programa:

1)	97°C	3 min
2)	97°C	30 s
3)	T_a^* °C	15 s
4)	60°C	4 min
5)	Repetir 30 cops els passos 2-4	
6)	4°C	∞

*Temperatura d'*annealing* del *primer* (ajustar a $\sim$ 5°C per sota de la T_m del *primer* usat per seqüenciar)

3. Purificació de les seqüències: s'ha utilitzat les columnetes de sephadex Autoseq G-50, seguint les instruccions del fabricant
4. Guardar el *pellet* sec (protegit de la llum) a 4°C fins a la seva posterior preparació per punxar la mostra:
 - i) Resuspendre'l bé en 8 μ L de TSR
 - ii) Fer un *spin* breu
 - iii) Desnaturalitzar 4 min a 94°C
 - iv) Centrifugar breument i clavar en gel
 - v) Guardar a 4°C a les fosques.

Seqüenciació manual

Com ja s'ha esmentat, hem utilitzat el kit de USB basat en l'enzim *thermosequenasa*, una DNA polimerasa modificada amb excel·lents rendiments. Com a isòtop radioactiu s'ha utilitzat fòsfor-33, incorporat en forma de α -³³P]-dATP, que ofereix una major sensibilitat i resolució respecte al fòsfor-32, el que facilita la lectura i el discerniment de les bandes de en el gel seqüència.

Reactius:

- Material subministrat amb el kit (*thermosequenase*, ddNTPs, etc.) [USB]
- HCL 1M

- [α -³³P]-dATP a 10 mCi/mL
- Gel d'acrilamida 6 % (w/v)/urea 8 M
- Solució fixadora

Procediment

1. Desnaturalitzar el motlle de DNA (8 μ L) amb 2 μ L de NaOH 1M i en presència de 1mL de *primer* (a 2 μ M)
 2. Incubar 10 min a 37°C; refredar en gel
 3. Neutralitzar amb 2 μ L de HCL i 2 μ L de PRB
 4. Incubar 10 min a 37°C. Clavar en gel
 5. Afegir 1 μ L de DTT 0,1M, 2 μ L de *labeling mix*, 1 μ L de [α -³³P]-dATP
 6. Incubar 5 min a temperatura ambient
 7. Aliquotar els dideoxinucleòtids individuals en tubs separats (2,5 μ L de cada: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP)
 8. Transferir 4,5 μ L de la barreja obtinguda al pas nº5 a cada un dels tubs de ddNTP
 9. Incubar 5 min a 37°C
 10. Aturar la reacció de marcatge amb 4 μ L de *STOP solution*
 11. Desnaturalitzar les mostres 2 min a 75°C. córrer el gel de seqüència d'acrilamida/urea immediatament, o guardar-les congelades a -20°C (per un màxim d'una setmana)
 12. Desmuntar el gel vertical de seqüència, fixar-lo en solució fixadora (àcid acètic 5% (v/v) /metanol 15% (v/v))
- Assecar el gel fixat a l'assecador sobre paper WHATMAN 3MM i exposar-lo amb una pel·lícula autoradiogràfica de 12-20 h.

2.4. ANÀLISI DE RNA

2.4.1. NORTHERN-BLOT

La transferència de RNA des de gels desnaturalitzants, on s'ha separat electroforèticament en funció de llur grandària, a filtres de nitrocel·lulosa o niló, és una tècnica anàloga al *Southern-blot*, on l'àcid nucleic transferit era DNA. En aquest cas però, s'han de prendre certes precaucions, doncs el RNA es pot degradar molt fàcilment i cal realitzar totes les manipulacions amb cura, especialment els gels d' agarosa/formaldehid, que son especialment fràgils. Tots els reactius, material i tamps hauran de ser sense ribonucleases.

Pel que respecta a l'apartat d'hibridació dels filtres de RNA, al igual que en la tècnica de *Southern-blot* (veure secció 2.3.1), s'han seguit les instruccions del fabricant de les membranes per a les hibridacions amb sondes de DNA, amb algunes variacions.

Reactius

- MOPS 20x
- Formaldehid 37%
- Formamida desionitzada
- TAE 1x
- Agarosa; H₂O-DEPC
- SSC 20x
- SDS 20 % (w/v)
- Tampó de càrrega

Procediment:

Electroforesi en gels d'agarosa desnaturalitzants

1. Preparació del gel de formaldehid: (V_{final} de 200 mL per un gel gran):

MOPS 1x
Formaldehid 18% (v/v)
Agarosa 1,1%
(tot preparat en H₂O-DEPC)

2. Es desfà al microones l'agarosa amb aigua, deixant-ho refredar fins a uns 50-60°C un cop dissolta. Llavors afegim a poc a poc i remenant-ho alhora el MOPS i el formaldehid (a la campana de fums); es barreja bé i abans de que solidifiqui s'afegeix en el portagels de metacrilat.
3. Preparació de les mostres de RNA: La quantitat de RNA dependrà de si es tracta d'RNA total (15 µg) o poli(A)⁺ (3-5 µg), en cas de estar massa diluït, podem concentrar les mostres al *speed-vac*

i) Es prepara, seguint l'ordre indicat, la següent barreja final per cada mostra: (ajustem els volums amb H₂O-DEPC, si cal)

RNA
MOPS 1x
Formaldehid 18% (v/v)
Formamida 50% (v/v)

- ii) Les mostres es desnaturalitzen 10 min a 65°C, carregant-les en el gel després d'haver-hi afegit tampó de càrrega (1x: 5,3 % (w/v) glicerol, blau de bromofenol 0,53 % (w/v))
- iii) El gel es fa córrer a 60 V durant 4-5 hores o a 20V durant tota la nit, en el tampó d'electroforesi MOPS 1x

Transferència

4. Acabada l'electroforesi, es retira el gel de la cubeta i es deposita en una safata, realitzant tres rentats de 15 min amb aigua destil·lada, per tal d'eliminar-ne el formaldehid residual
5. Equilibrar el gel durant 45 min en SSC 20x
6. Transferència del RNA per capil·laritat a una membrana de niló *Zeta-Probe* [BIO-RAD]. Es disposa el mateix muntatge experimental que en el cas del *Southern-blot* (descriu a la pàg. 120)
7. Deixar transferint tota la nit. Al'endemà, desmuntar la transferència recuperant la membrana, que s'esbandeix breument en SSC 2x per eliminar-hi

restes d'agarosa i de sals

8. Fixar el RNA a la membrana mitjançant irradiació amb UV
9. Guardar els filtres secs entre dos fulles de paper Whatman fins a la seva utilització

Hibridació

10. Enrotllar la membrana dins un tub d'hibridació sense generar bombolles. Afegir un petit volum de solució de pre-hibridació (15-20 mL si es un tub gran i 10-15 mL si es un de petit).

Solució de prehibridació/hibridació: (veure apartat "protocol d'hibridació" de la tècnica *Southern-blot*, seccio 2.3.1, pàgina 120)

11. Pre-hibridar a 42°C un mínim de 5 min (recomanable 15-30 min per assolir un bloqueig màxim) a un forn d'hibridació amb rotació constant
12. Bullir 5 min la sonda radioactiva de DNA (vegeu apartat etetcetc)
13. Hibridar tota la nit a 42°C amb el mateix tampó referit prèviament, contenint la sonda desnaturalitzada i a una concentració de 1-3x10⁶ cpm/mL de tampó
14. Al dia següent, realitzar els subsegüents rentats de la membrana (volums 300-400 mL):
 - i) Quatre rentats de 5 min amb SSC 2x/ SDS 0.1% (RT)
 - ii) Un rentat de 15 min amb SSC 0,5x/ SDS 0,1% (RT)
 - iii) Un rentat de 1 h amb SSC 0,1x/SDS 0,1% (50°C)
15. Finalment, escórrer bé el filtre tot embolicant-lo amb un film de plàstic transparent (*Saranwrap*) per tal de que no s'assequi i exposar-lo a -70°C amb un film autoradiogràfic *hyperfilm* [AMERSHAM], en cassettes de raigs-X.

2.4.2. RT-PCR

Amb la RT-PCR o transcripció inversa-PCR es pot aconseguir amplificar un mRNA determinat fins al cDNA doble cadena corresponent. Tradicionalment la tècnica es realitzava en dues etapes consistents en una transcripció inversa (RT) inicial, a partir de RNA missatger (i utilitzant un *primer* 'antisense' específic, o alternativament un oligonucleòtid oligo-dT₁₇), eliminació posterior del RNA motlle, i reacció d'amplificació per PCR pròpiament dita,

de la 1^a cadena de cDNA generada prèviament. A nivell comercial, en els últims anys han sorgit varis kits comercials basats en formulacions d'una barreja de transcriptasa inversa i d'una *Taq* polimerasa, en un tampó de reacció mixta; utilitzant unes condicions d'amplificació determinades, amb aquests reactius es possible realitzar la síntesi del cDNA acoblada a la PCR en un únic tub, utilitzant un parell d'oligonucleòtids específics.

El *kit* per el qual ens hem decantat ha estat el *one-step RT-PCR kit* de GIBCOBRL, que ofereix un rendiment de síntesi força elevat. En quan a les condicions de reacció, s'ha seguit les instruccions subministrades pel fabricant amb la modificació del volum final suggerit (100 μ L) a la meitat.

2.4.3. AMPLIFICACIÓ RÀPIDA DE L'EXTREM 5' DEL cDNA (5'-RACE)

Essencialment s'ha seguit -amb algunes modificacions- el protocol descrit inicialment per Frohman, M.A. *et al.*, [282]. La tècnica consta de dues etapes, en la primera es sintetitza el cDNA complementari a partir del corresponent missatger; en la segona etapa, s'amplifica l'extrem del cDNA mitjançant una sèrie de reaccions de PCR encadenades. La primera cadena de DNA complementari s'ha retro-transcrit a partir de mRNA poli(A)⁺ de ronyó de ratolí (mascles adults de la soca 129/Sv) extret segons el protocol detallat en la secció 1.1. En la segona etapa, mitjançant l'ús de l'enzim desoxinucleotidil terminal transferasa (TdT) i de dATP, s'afegeix una cua de poli(A) en l'extrem 3' de la primera cadenes de cDNA sintetitzades. A continuació es realitzen diverses rondes consecutives de PCR *semi-nested*, amb *primers* 'antisense' específics del gen i *primers* 'sense' d'ancoratge a la cua de poli(A) afegida al extrem 5'.

Reactius:

- Reactius per PCR i RT-PCR
- Desoxinucleotidil terminal transferasa [ROCHE]
- *Kit* de purificació de productes de PCR

Procediment

1) SÍNTESI DE LA PRIMERA CADENA DE cDNA:

Transcripció inversa

1. En un microtub mantingut en gel, afegir:
 - 1 μ g de RNA total o 100 ng mRNA poli(A)⁺
 - 2 pmol totals de *primer* específic
 - H₂O-DEPC fins a 12 μ L
2. Escalfar 10 min a 70°C; afegir-hi:
 - 4 μ L 5x 1st Strand buffer[†]
 - 2 μ L DTT 0.1 M[†]
 - 1 μ L dNTP mix 10 mM
3. Barrejar i incubar 2' a 42°C; afegir a continuació:
 - 1 μ L (200U) *SuperScriptII Reverse Transcriptase*[†]
4. Incubar 50' a 42°C

[†]GIBCOBRL

5. Inactivar l'enzim 15 min a 42°C

Eliminació del RNA

6. Afegir al tub on s'ha realitzat la transcripció inversa:
 - 1 μ L (1U) de *RNasa H* [BOEHRINGER MANHEIM]
7. Incubar 20 min a 37°C

Purificació del cDNA:

Per la purificació del cDNA obtingut en la reacció anterior s'utilitzaren els components i les instruccions del *kit* de QIAGEN i el de ROCHE (veure apartat 1.7), eluïnt finalment el DNA amb 30 μ L.

2) REACCIÓ DE *TAILING* I RONDES D'AMPLIFICACIÓ PER PCR*Tailing*

1. Muntar la següent reacció:

- 10 μL del cDNA sintetitzat i purificat en les etapes anteriors
- 5 μL de *5x TdT buffer*[‡]
- 7,5 μL de CoCl_2 5mM (1,5 mM de concentració final en la reacció)
- 2 μL de dATP 2mM (160 μM de concentració final)

2. Escalfar 3 min a 94°C, refredar en gel

3. Afegir 0,5 μL (12,5U) de TdT[‡]

4. Incubar 10 min a 37°C

5. Aturar i inactivar la reacció escalfant 10 min a 70°C

[‡]BOEHRINGER MANHEIM*Primera ronda d'amplificació per PCR*

1. Pipetejar els següents components dins un tub de PCR en gel:

- 5 μL de *1st strand*-AAAA cDNA
- 5 μL de *10x PCR buffer*^{*}
- 1 μL de dNTP mix 10 μM
- 1 μL de *primer anchor APdT₁₇* 10 μM
- 1 μL de *primer GSP-1* 10 μM
- H₂O fins a 50 μL
- 2,5U de Taq polimerasa

^{*}Ja inclou el Mg^{2+} (15 mM)

2. Barrejar, posar el tub al termociclador i iniciar la PCR:

- 1) 94°C 2 min
- 2) 94°C 15 s
- 3) 55 °C 30 s

4) 72°C 30-60 s

5) Repetir 35 cops els passos 2-4

6) 4°C ∞ *Segona ronda d'amplificació per PCR*3. (Opcional) Purificar la PCR anterior, eluint-la en 50 μL 4. Diluir (amb H₂O destil·lada) $1/20$ i $1/100$ els productes d'amplificació de la PCR anterior5. Muntar la segona PCR en gel (un tub per cada dilució del motlle de la 1^a PCR):1 μL de la 1^a PCR ($1/20$ i $1/100$)5 μL de *10x PCR buffer*^{*}1 μL de dNTP mix 10 μM 1 μL de *primer AUAP* 10 μM 1 μL de *primer GSP-2* 10 μM H₂O fins a 50 μL

2,5 U de Taq polimerasa

6. Barrejar, posar els tubs al termociclador i iniciar la PCR:

1) 94°C 2 min

2) 94°C 15 s

3) 58°C 30 s

4) 72°C 30-60 s

5) Repetir 35 cops els passos 2-4

6) 4°C ∞

Els aparells de PCR utilitzats han estat el *GeneAmp PCR system 2400* (PERKIN ELMER) i el *PTC-100* (MJ RESEARCH)

^{*} ja inclou el Mg^{2+} (15 mM)TAULA XX. *Primers d'anclatge utilitzats en el 5'-RACE*

Nom	Seqüència (5'-3')	T _m (°C)	Orientació [‡]
APdT ₁₇	GGCCACGCGTCGACTAGTAC (T) ₁₇	67,4	<i>fwd</i>
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	63,5	<i>fwd</i>

[‡]*fwd*: orientació directe

NOTA: La resta de *primers* específics utilitzats per cada gen, s'indica al corresponent apartat de la secció RESULTATS.

2.4.4. PRIMER EXTENSION

Aquesta tècnica s'utilitza per determinar de manera precisa l'inici(s) de transcripció donat d'un gen. Consisteix en l'anellament específic sobre mRNA d'un *primer* del gen en qüestió, que s'exten ha continuació mitjançant la transcriptasa inversa, de manera que es genera una cadena de llargada que correspon exactament a la distancia des de l'inici del transcrit fins el punt d'ancoratge.

La tècnica consta de dos etapes: en la primera es realitza el marcatge radioactiu amb fòsfor-32 de l'oligonucleòtid que posteriorment servirà d'encebador per la reacció d'extensió. Paral·lelament es pot dur a terme la reacció de seqüenciació manual, també radioactiva, utilitzant aquest mateix oligonucleòtid sobre un motlle de DNA que compregui el punt d'ancoratge del *primer* així com el putatiu inici de transcripció (preferiblement, el fragment a seqüenciar té que contenir un tros de la regió flanquejant 5' del gen). En la segona etapa, es procedirà a l'anàlisi dels fragments extesos en un gel de seqüència d'acrilamida/urea, juntament amb la reacció de seqüenciació manual (veure apartat 2.3.3.).

Reactius:

- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (~300 Ci/mmol, 10 mCi/mL) [AMERSHAMPHARMACIA]
- *T4 polynucleotide kinase* (PNTK) [PROMEGA]
- EDTA
- *SuperscriptII RT* [LIFE TECHNOLOGIES]
- *RNasin* [PROMEGA]
- Columnetes Microspin G-25 [AMERSHAMPHARMACIA]
- Etanol absolut i al 70%

Procediment:

Marcatge terminal d'oligonucleòtids a l'extrem 3'

1. Disposar la següent reacció de marcatge:

$V_{\text{final}} 10 \mu\text{L}$

2 μL H_2O -DEPC
1 μL 10x PNTK buffer
1 μL oligo 10 μM (10 pmol totals de <i>primer</i>)
5 μL $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$
1 μL <i>T4 polynucleotide kinase</i>

2. Incubar la reacció de marcatge 30 min a 37°C
3. Purificació (per gel-filtració) de l'oligonucleòtid marcat: s'utilitzaran les columnetes comercials Microspin G-25, seguint les indicacions del fabricant. El volum final obtingut és d'aproximadament 50 μL (~200 fmol de *primer* / μL)

Annealing i extensió

1. Muntar la següent reacció d'*annealing*:

15 μg RNA total /1.5 μg de RNA poli(A)⁺

$V_{\text{final}} 12 \mu\text{L}$

1 μL d'oligonucleòtid marcat (~200 fmol)
H_2O -DEPC fins a un total de 12 μL

2. Desnaturalitzar la barreja 2 min a 90°C
3. Deixar refredar lentament fins assolir la T_m del *primer*
4. Mantenir el tub a aquella temperatura durant 30

min més

5. Posar el tub en el gel

Extensió (reacció de transcripció inversa)

6. Afegir al tub anterior els següents components:

4 μL de 5x 1st Strandbuffer

1 μL *RNasin*

1 μL dNTP's mix 10 mM

1 μL *Superscript II RT* 200 U/ μL (200 U totals)

$V_{\text{final}} 10 \mu\text{L}$

7. Incubar 2 h a 42°C
8. Aturar la reacció afegint 3 μL d'EDTA 0.2 M
9. Afegir 1 μL de RNasa A a 10 mg/mL
10. Incubar-ho 30 min a 37°C per tal d'eliminar el RNA

Precipitació

11. Afegir 36 μL d'etanol absolut
12. Deixar precipitant de 20-30 min a -20°C
13. Centrifugar 5 min a 14.000 rpm
14. Rentar amb 100 μL d'etanol al 70%
15. Descartar el sobrenedant i deixar assecar lleument

16. Redissoldre el *pellet* en 5 μ L de tampó de càrrega; (Abans de carregar en el gel de seqüència, congelar desnaturalitzar la mostra durant 10 min a 75°C).
17. Analitzar els productes d'extensió en un gel vertical de seqüència d'acrilamida/urea al 6%

2.4.5. HIBRIDACIÓ *IN SITU*

Per realitzar la tècnica d'hibridació *in situ*, s'ha optat per un protocol no radioactiu amb l'utilització de ribosondes fredes marcades amb digoxigenina i detectades immunohistoquímicament. Els mètodes basats en digoxigenina i d'altres estan desplaçant progressivament els protocols originaris basats en sondes marcades amb isòtops radioactius, com el ^{35}S . Tot i que l'ús de sondes marcades radioactivament pot oferir una sensibilitat superior, com a principals limitacions presenta el fet de requerir temps d'exposició llargs i la seva relativa poca resolució, a més a més dels inconvenients inherents a la manipulació de material radioactiu. Alternativament, els protocols no radioactius presenten les avantatges d'oferir una excel·lent resolució histològica, la conservació perllongada de les sondes marcades, així com la reducció de la duració total de la tècnica (sobretot escurçant considerablement el temps de revelat).

Existeixen infinitat de protocols i variants de la tècnica en qüestió, donada la seva elevada nombre d'etapes i passos amb múltiples possibilitats de modificar-ne diferents paràmetres, i els vàlids per detectar l'expressió d'un gen determinat no tenen per que funcionar amb d'altres gens, per tant no cal afegir que cal posar-la a punt minuciosament i afinar les condicions per el nostre problema de detecció en concret. Un compendi més detallat de la tècnica utilitzada essencialment aquí, pot trobar-se a [283]

Donada la proverbial labilitat del RNA, i l'extremada sensibilitat que s'exigeix a la tècnica, tots els procediments i materials utilitzats hauran de complir la normativa "mancat de ribonucleases", es a dir, tot el material de vidre s'ha hagut d'inactivar tèrmicament al forn a 200°C durant un mínim de 2 h per tal d'eliminar-ne les possibles ribonucleases existents sobre llur superfície

Totes les solucions i tampons es preparen en condicions *free*, amb H_2O destil·lada tractada amb dietilpirocarbonat (DEPC) al 0,05% (v/v) per tal d'inactivar-ne les RNases, seguit d'autoclavat per tal d'eliminar el DEPC residual que podria interferir en les passos posteriors.

Tractament dels portaobjectes

Abans de la seva utilització cal fer un tractament previ dels portaobjectes [CELL-LINE ASSOCIATES] per eliminar-hi les possibles impureses de la superfície i recobrir-los amb una solució adhesiva que permeti que la secció de teixit no es desenganxi al llarg de tot el procés posterior. Totes les solucions i material de vidre utilitzat es prepararan lliures de RNases.

Reactius:

- HCl 0,2 N
- Acetona
- Gelatina 4,5 % (w/v)/azida sòdica al 1 % (w/v)
- Poli-L-Lisina en solució al 0,1% (w/v) [SIGMA]

Procediment:

1. Submergir els portaobjectes durant 30 s en HCl 0.2 N
 2. Rentar durant 30 s en H₂O destil·lada
 3. Submergir 30 s més en acetona
 4. Deixar assecar a l'aire
 5. Immernir els portaobjectes 5 min en gelatina/azida 1% (*subbing solution*)
 6. Retirar-los de la *subbing solution* i deixar assecar a l'aire tota la nit
 7. Tractar els portaobjectes dues vegades amb poli-L-Lisina diluïda al 0,01%, durant 10 min cadascuna
 8. Rentar 1 min amb H₂O destil·lada
 9. Escórrer bé els portaobjectes i deixar-los assecar completament (tota la nit, si cal)
- Guardar-los en una cambra dessecant fins a la seva utilització.

Preparació de seccions histològiques de teixit

Els teixits murins, principalment ronyó, s'extreuen i es congelen immediatament en N₂ líquid dins de uns motlles especials (immersos en una solució crioprotectora [OCT]), guardant-se a -80°C fins el seu processat. Els talls de teixit, d'unes 5-10 µm de gruix, s'han realitzat a baixes temperatures (-20°C) mitjançant un Criostat [BRIGHT INSTRUMENTS Co]; els ronyons s'han seccionat longitudinalment recollint-se només aquells talls profunds en les que es poden apreciar tots els compartiments renals, especialment les parts mes internes com la medul·la i el pelvis renal. Les seccions escollides es disposen sobre els portaobjectes prèviament tractats (*vide supra*). Cal fer notar que aquests portaobjectes, consten de 3 anelles de tefló (dins de les quals es recullen les seccions), i que mantindran totes les solucions amb les que es tracti a les mostres circumscrites dins l'anella, evitant l'utilització innecessària de cobreobjectes durant la hibridació i preservant així millor la morfologia del teixit.

Preparació de les sondes

Per sintetitzar les ribosondes s'utilitzarà una reacció de transcripció *in vitro*, en presència d' UTP-digoxigenina que es el ribonucleòtid que s'incorporarà a la sonda de cRNA i permetrà la seva posterior detecció. El motlle per la reacció consistirà en un plasmidi recombinant que contingui les seqüències promotores dels fags T7 o SP6 (proveïdes en el vector) immediatament en front del fragment de cDNA del gen en qüestió clonat en orientació sentit i antisentit respectivament. La reacció de marcatge es realitza amb el *DIG RNA Labeling kit*(SP6/T7) de ROCHE. Un cop marcada la/les sonda/es, es comprovarà l'eficiència del marcatge i s'estimarà la concentració de la ribosonda mitjançant la tècnica de *dot-blot* amb detecció immunològica. Per el *Cyp4b1*, s'ha utilitzat el fragment de cDNA corresponent als nucleòtids 23-478, clonat darrera del promotor de T7 en sentit directe i invers per sintetitzar la sonda *sense* i *antisense*, respectivament.

Reactius:

- Acetat sòdic 3 M, pH 5,5
- Etanol
- RNasin [PROMEGA]
- Anticòs anti-digoxigenina-AP [ROCHE]
- NBT i BCIP [ROCHE]
- Kit de marcatge[*DIG RNA Labeling kit* (SP6/T7), ROCHE]

Procediment:

linearització del motlle plasmídic

1. Digerir 10 µg del plasmidi, l'insert del qual es vol transcriure
2. Comprovar que la digestió hagi estat completa, inactivar tèrmicament l'enzim 15 min a 65°C

3. Afegir 1/10 part (en volum) d'acetat sòdic 3M, pH 5,5, barrejar suaument
4. Precipitar el DNA amb 2.5 volums d'etanol absolut, vortexar
5. Centrifugar 15 min a 14.000 rpm
6. Rentar amb etanol al 70%, repetir el pas n° 5
7. Assecar el *pellet* a l'aire
8. Redissoldre el DNA en 10 μ L d'H₂O·DEPC
9. Mesurar-ne la concentració llegint l'absorbància a 260 nm
10. Congelar a -20°C
5. Vortexar i deixar precipitant a -20°C durant 2 h
6. Centrifugar 15 min a 14.000 rpm (4°C)
7. Rentar amb etanol al 95%
8. Repetir el pas n° 6
9. Resuspndre el *pellet* final de cRNA (amb digoxigenina incorporada) en 100 μ L.

Dot-Blot

Marcatge de la sondes mitjançant transcripció *in vitro*

1. Disposar la següent reacció de marcatge d'RNA (en gel):

H₂O·DEPC fins a 13 μ L V_{final} 20 μ L
 1 μ g de motlle plasmídic linearalitzat
 2 μ L de 10xNTP labeling mixture[†]
 2 μ L de 10xTranscription buffer[†]
 2 μ L de RNasin [PROMEGA] (inhibidor de ribonucleases)
 1 μ L de T7 o SP6 RNA polimerases[†], segons el cas

2. Incubar la reacció 2h a 37°C
3. Afegir a cada tub 2 μ L de DNasa I[†]

[†] Subministrats amb el kit

4. Precipitació de la ribosonda: afegir als tubs de marcatge,

2 μ L de tRNA
 2 μ L d'acetat potàssic 3M, pH 5
 75 μ L d'etanol absolut fred (a -20°C)

1. Depositar gotes d'1 μ L de cadascuna de les sondes marcades prèviament, així com del RNA-digoxigenina control sobre una membrana de nitrocel·lulosa
2. Assecar be les gotetes amb l'ajut, si cal, d'un assecador de mà
3. Bloqueig de la membrana, 1h a temperatura ambient en tampó de bloqueig:

Llet descremada [Sveltesse, NESTLE] al 4 % (w/v)
 en PBS-Tween 0,15% (v/v)

4. Anticòs 1^{ari}: 1h a temperatura ambient amb anticòs anti-digoxigenina (veure protocol següent, 2^a part) diluït 1/1000 en tampó de bloqueig
5. Rentar tres vegades amb PBS 1x durant 5 min (i amb agitació)
6. Revelat: revelar les membranes (protegit de la llum) amb tampó de revelat contenint 33 μ L de NBT + 16,5 μ L de BCIP (veure secció següent, 2^a part), de 5-10 min a temperatura ambient fins que aparegui el color.

Protocol d'Hibridació

El protocol consta de dos parts: en la primera, es realitzarà l'hibridació *in situ* RNA:RNA pròpiament dita, incubant les seccions de teixit amb la ribosonda marcada amb digoxigenina, que hibridarà específicament amb el missatger del qual és complementària.

En la segona part del protocol, es detectarà l'epítip 'digoxigenina' de les sondes que hagin hibridat específicament amb el RNA missatger, utilitzant un anticòs policlonal comercial (fet a ovella), anti-digoxigenina conjugat a l'enzim fosfatasa alcalina (AP) [ROCHE]. La detecció es duu a terme mitjançant els substrats colorimètrics NBT (*nitroblue tetrazolium*) i el BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate*), que formen un precipitat blau-violet insoluble.

1ªPART: HIBRIDACIÓ DE LES SECCIONS AMB LA RIBOSONDA MARCADA

Reactius:

- H₂O·DEPC
- Paraformaldehid (PFA) 4 %
- PBS-DEPC 1x*
- TE-DEPC 1x
- *Proteinasa K* 10 mg/mL [ROCHE]
- SSPE·DEPC 20x
- Trietanolamina (TEA)
- Anhídrid acètic
- Formamida desionitzada
- Dithiotreitol (DTT)

Procediment:**Fixació*

1. Treure les seccions de l'ultracongelador i dexar-los atemperar durant uns 20 min
2. Fixar les mostres amb PFA al 4% durant 20 min (a RT)
3. Rentar 2 cops amb PBS 1x

Permeabilització

4. Diluir al moment la *Proteinasa K* stock a 5 µg/mL en TE 1x i aplicar-la a les seccions
5. Incubar-les 15 min a 37°C, tot evitant que s'assequin (utilitzar una cambra humidificada com a recipient)
6. Rentar 5 min en PBS 1x

Post-fixació

7. Fixar els teixits una altra volta amb PFA al 4% fresc durant 20 min
8. Repetir el pas nº 6
9. Esbandir els talls en H₂O

Acetilació

10. Preparar (al moment) en una cubeta la següent solució:

SSPE 4x
TEA 1,3% (v/v), pH 8,0 (ajustar amb HCl)
Anhídrid acètic 0,25% (v/v)

11. Incubar els *slides* 10 min en la solució previa
12. Rentar 5 min en PBS 1x

Prehibridació

13. Es disposen els portaobjectes dins una cambra humida (que contingui SSPE 5x /Formamida 50%)
14. Prehibridar durant 2h a 42°C en el següent tampó de prehibridació:

Formamida 50%
SSPE 5x
ssDNA 100 µg/mL

Deshidratació

15. Preparar les següents cubetes amb el contingut indicat a continuació:
 - i) Etanol al 30% (v/v en H₂O-DEPC)
 - ii) Etanol al 70% (*idem*)
 - iii) Etanol absolut
16. Deshidratar seqüencialment (i-ii-iii) les mostres, mantenint-les 5' en cadascuna de les cubetes
17. Deixar assecar els portes. a l'aire

Hibridació

18. Es prepararà tampó d'hibridació nou (és el mateix que la solució de prehibridació)
19. Desnaturalitzar la ribosonda durant 2 min a 80°C
20. Barrejar-la amb la solució d'hibridació, i afegir la barreja a les seccions (en el mínim volum possible). La concentració final òptima de sonda és de 0,5-1 µg/mL
21. Incubar a 42°C de 16-24h en una cambra humidificada (amb SSPE 5x / Formamida 50%)

Rentats

22. Realitzar (tot mantenint una agitació suau) els següents rentats amb:
 - i) SSPE 4x/DTT 20 mM 30 min
 - ii) SSPE 4x 30 min
 - iii) SSPE 1x 15 min (repetir 2 vegades)
 - iv) SSPE 1x 30 min a 65°C
 - v) SSPE 0,1 30 min a 65°C (repetir 1 vegada)
 - vi) Esbandir amb PBS 1x i escórrer bé

*NOTES: Per facilitar-ne la claredat, al llarg de tot el protocol descrit a continuació s'utilitzaran els noms abreujats d'alguns tamps, entenent-se que han estat tractats amb DEPC tot i no indicar-ho i que es tracta doncs dels mateixos indicats a sobre; Si no s'indica el contrari, totes les

incubacions han d'ésser interpretades a temperatura ambient

2^a PART: IMMUNODETECCIÓ MITJANÇANT ANTICOSSOS ANTI-DIGOXIGENINA-AP

Reactius:

- Albúmina (BSA) [SIGMA]
- *Normal horse serum* [SIGMA]
- PBS 1x
- Anticòs anti-Digoxigenina-AP [ROCHE]
- Tampó de revelat: Tris-Cl 100 mM, pH 9,5
NaCl 10 mM, MgCl₂ 50 mM.
- BCIP [ROCHE]
- NBT [ROCHE]

Procediment:

Bloqueig, anticòs i rentats

23. Preparar el següent tampó de bloqueig:

Albúmina al 4% (w/v en PBS)

Sèrum normal de Cavall al 5% (*id.*) [SIGMA]

24. Bloquejar les seccions 1 h amb la solució anterior

25. Afegir l'anticòs anti-Digoxigenina-AP diluït $1/1000$
en tampó de bloqueig, incubar (dins la cambra
humida) tota la nit a 4°C

26. Rentar amb PBS 1x durant 5 min (4 vegades)

Revelat

27. Pre-equilibrar les seccions 5 min amb el següent
tampó de revelat:

Tris-HCl 100 mM, pH 9,5

NaCl 10 mM

MgCl₂ 50 mM

28. Afegir a la solució els substrats:

45 µL de NBT i 35 µL de BCIP / 10 mL del
tampó anterior

29. Revelar protegit de la llum durant 30-60 min a
temperatura ambient o fins que es desenvolupi
suficientment la senyal (alternativament es pot
deixar o/n a 4°C)

30. Aclarar els portaobjectes amb PBS 1x i després
amb H₂O destil·lada.

31. Muntar les mostres amb medi de muntatge
hidròfil [AQUATEX]

3. SCEENING DE LLIBRERIES DE DNA

3.1. SCREENING D'UNA LLIBRERIA GENÒMICA DE RATOLÍ

L'obtenció de clons genòmics s'ha realitzat mitjançant el *screening* d'una llibreria genòmica de ratolí (*mouse genomic library*, λFIXII, STRATAGENE) de fags lambda recombinants, construïda comercialment a partir de DNA genòmic de la soca 129Sv/J. Per assegurar-se una representativitat màxima, s'han sembrat –infectant bacteris de la soca apropiada– aproximadament 1 milió de clons independents en forma de clapes de lisi, repartides en diverses plaques grans que constituïran la llibreria genòmica. Posteriorment, es realitzen rèpliques de les plaques en membranes de nitrocel·lulosa, que seran hibridades amb sondes del cDNA corresponent al gen d'interès, marcades amb ^{32}P . Els clons positius identificats mitjançant autoradiografia, seran sotmesos a successives rondes de purificació i enriquiment fins a aconseguir una mostra homogènia on tots els fags presents siguin derivats idèntics al positiu inicial.

Reactius

- Plaques NZY
- “top-agar”
- MgSO_4 100mM
- Maltosa 20%
- Tampó SM
- Nitrocel·lulosa
- Plaques NZY
- Bacteris XL1-Blue MRA
- Tampó d'hibridació
- Solucions de rentat
- Llibreria genòmica

Procediment:

TITULACIÓ DE LA GENOTECA GENÒMICA EN FAG λFIXII

Preparació dels bacteris ‘amfitrions’ de la infecció

1. Inocular 50 mL de medi LB sense antibiòtic (suplementat amb maltosa al 0,2% (w/v) i MgSO_4 10 mM) amb una colònia aïllada de la soca XL1-Blue MRA (P2), amfitriona del bacteriòfag λ
2. Créixer-ho tota la nit a 30°C amb agitació forta (200-225 rpm), en un flascó gran que permeti una màxima aeració del cultiu
3. Al dia següent, centrifugar els bacteris durant 10 min a 2.000 rpm, per tal de sedimentar-los
4. Decantar amb cura el sobrenedant i resuspendre el *pellet* bacterià en un cert volum (de 1-10 mL, segons la grandària del *pellet*) de MgSO_4 10 mM estèril
5. Diluir la suspensió anterior amb MgSO_4 10 mM fins a 0,5 unitats de densitat òptica (registrant l'absorbància a 595 nm). Guardar a la nevera no més de 2-3 dies

Infecció

6. Preparar amb tampó SM estèril, una successió de

dilucions seriades ($1/10 \dots 1/10.000$) de la genoteca dels fags original

7. Desfer el ‘NZY-agarose’ al microones i al·liquotar-lo estèrilment en al·liquot de 3 mL, tot mantenint-les a 48-50°C sense que solidifiquin
8. Infectar 200 mL dels bacteris de l'apartat n° 5, amb 1 µL de cadascuna de les dilucions dels fags
9. Incubar la barreja durant 15 min a 37°C amb agitació suau
10. Afegir els 3 mL líquids del “top-agar” (tot en condicions estèrils) al tub dels bacteris/fags i remenar-ho per inversió suaument i decidida
11. Sense perdre temps, abocar la mescla anterior sobre l'agar d'una placa de Petri de 90 mm, prèviament temperada a 37°C, procurant que quedi coberta tota l'extensió de la placa i evitant les bombolles
12. Deixar solidificar la fina pel·lícula d'agar i de bacteris durant uns minuts, transcorreguts els quals ja es poden transportar les plaques a l'interior de l'estufa de bacteris, incubant-les de

bocaterrosa a 37°C durant 8-12 h

13. L'endemà al matí treure les plaques, comptar-ne les clapes de lisi i fer els càlculs del títol estimat de la genoteca original:

$títol (pfu/mL) \equiv \text{número de clapes} \times \text{factor de dilució} \times 10^3$

El títol calculat de la genoteca de la que disposàvem fou $\sim 1 \times 10^9$ *pfu*/mL

SEMBRA DE LA GENOTECA λ FIXII

Un cop determinada la concentració dels fags per titulació, es fan els càlculs per tal de que a cada placa gran apareguin aproximadament 100.000 clapes de lisi. Es plaquejaren al voltant de 1×10^6 fags, repartits en 10 plaques de petri quadrades de 23 x 23 cm [NUNC], assolint-se una densitat resultant d'aproximadament 200 calbes/cm².

1. Prèviament a la sembra dels fags, preparar les plaques d'NZY-agar (~ 300 mL /placa) dos o tres dies abans. Es mantindran a 37°C 2-3 h abans de l' infecció per tal de que estiguin ben seques i temperades
2. També es prepararan bacteris amfitrió XL1-blue MRA(P2) D.O. 0,5 frescos (veure punts 1-5 de l'apartat anterior), per tal d' ésser infectats amb els fags de la genoteca
3. Per fer les infeccions, es prepararan 10 tubs estèrils amb 45 mL de top-agar líquid a 48-50°C en cadascun d'ells
4. Infeccions: barrejar 1,8 mL de bacteris amfitrió amb 1×10^5 fags (*i.e.* 10 μ L de la genoteca original)

per placa, incubant-ho suaument 15 min a 37°C

5. Sembrar: combinar la barreja fags/bacteris amb el top-agar desfet de l'apartat n° 3 i abocar-lo sobre el NZY-agar de les plaques grans quadrades (temperades a 37°C), procurant d'extendre'l per tota la superfície de la placa, i evitant la formació de bombolles

Un cop hagi solidificat, incubar les plaques invertides a l'estufa de bacteris a 37°C durant 6-8 h, o fins que les calbes siguin tot just apreciables, però sense que s'arribin a tocar unes amb les altres. Guardar les plaques de la genoteca a 4°C ben embolicades amb *parafilm*

REPLICACIÓ DE LA GENOTECA EN FILTRES DE NITROCEL·LULOSA

Es realitzaran dos rèpliques de cada placa amb membranes quadrades (22 x 22 cm) de Duaralose-UV™ [STRATAGENE]. La nitrocel·lulosa ofereix una màxima capacitat d'adsorció dels bacteriòfags i un mínim *background* en els senyals d'hibridació

1. Abans de fer les rèpliques, refrigerar les plaques a 4°C durant 1-2 h prèviament per tal de que s'endureixi l'agar i evitar que es desenganxi al fer els *liftings*
2. Numerar les plaques de la genoteca i tallar els filtres de duralose (2 per placa), numerant-los també. Tot el procés següent es realitzarà a la flama i les manipulacions dels filtres amb l'ajut de pinces MILLIPORE
3. Transferir per capil·laritat els fags recombinants de la genoteca als filtres, tot extenent-los sobre la superfície de les plaques durant 2 i 4 min (per la 1ª i 2ª rèpliques, respectivament) evitant les bombolles d'aire
4. Abans de retirar els filtres de sobre les plaques, marcar-los als extrems travessant-los amb una

xeringa plena de tinta, per tal de poder-los orientar posteriorment

5. Separar amb molta cura ("Pelar") els filtres de sobre l'agar de les plaques i disposar-los amb la cara que conté els fags adsorbits cap amunt sobre una safata, amb paper Whatman 3MM impregnat de les solucions descrites a continuació (tot a temperatura ambient)

Tractaments dels filtres

6. Realitzar els següents tractaments dels filtres (amb el cara dels fags mirant cap amunt, en safates amb paper whatman amarat de les solucions):
 - i) Desnaturalització, 2 min en NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M
 - ii) Neutralització, 5 min en NaCl 1,5 M/Tris-Cl 0,5 M pH 8,0

- iii) Esbandida, 30 s en SSC 2x/Tris-Cl 0,2 M pH 7,5
7. Deixar assecar els filtres cara amunt sobre paper Whatman 3MM
8. Fixar el DNA a la duralosa amb UV al *crosslinker* (2 cops per la cara dels fags i una per la cara contrària)
9. Guardar els filtres de la genoteca entre dos fulls de paper Whatman 3MM, fins a la seva hibridació. Les plaques mare de la genoteca es guarden a 4°C per a utilitzar-les posteriorment
6. Hibridar a 42°C durant tota la nit (12-16 h) amb agitació constant
7. Rentats:
 - i) Dos rentats de 5 min amb SSC 1x /SDS 0,1 % a RT
 - ii) Tres rentats de 15 min amb SSC 0,1x /SDS 0,1 % a 65°C
8. Després dels rentats, eliminar l'excés de líquid dels filtres hibridats i embolicats en plàstic sense deixar que s'assequin) exposar-los a -80°C amb films de raigs X [HYPERFILM] i pantalles intensificadores. S'han fet exposicions de 20-48 h
9. Revelar. Identificar els positius putatius, verificant-los amb els filtres segones-rèplica (tenen que coincidir) i localitzar-los en les plaques mare originals.

Hibridació (Screening primari)

1. Escalfar a -50°C la solució de pre-hibridació (*vide infra*) sense el DNA de salmó, bullir aquest durant 5 min i afegir-lo a la solució pre-temperada de hibridar els filtres de la genoteca en una carmanyola amb uns 200 mL de tampó de:

Formamida desionitzada 50 % (v/v)
 Pipes 2x
 SDS al 0.5% (w/v)
 DNA d'esperma de salmó,
 (sonicat i desnaturalitzat) a 100 µg/mL

2. Pre-hibridar els filtres de la genoteca a 42°C durant 3-4 h, en una carmanyola amb agitació suau
3. Marcar radioactivament la sonda amb la qual es farà el crivellatge de la genoteca
4. Retirar de la carmanyola la quantitat més gran possible de solució de prehibridació per tal de que l'hibridació es realitzi en el mínim volum de tampó possible (~125 mL) màxim per tal de que Afegir la sonda (0,5-1x10⁶ cpm/mL)
5. Bullir la sonda 5 min i afegir-la a la carmanyola amb els filtres (el tampó d'hibridació és idèntic al de pre-hibridació). Utilitzar un mínim de 1x10⁶ cpm/mL

Screening secundari

1. Picar de les plaques mare els presumptes clons positius identificats amb l'screening primari alineant els films amb les plaques. A tal efecte, realitzar (en condicions estèrils):
 2. Tallar un tros quadrat d'agar que cobreixi els voltants de la clapa de lisi alineada amb els positius dels films. Traspasar el "tac" d'agar dins un tub amb 1 mL del tampó SM i 20 µL de cloroform. Vortexar vigorosament, i guardar-lo a 4°C (és estable durant uns mesos)
 3. Amb aquests positius candidats picats, infectar novament cèl·lules i plaquejar-ho en plaques d'agar-NZY de 90 mm. Diluir la suspensió inicial de fags per tal de que quedin calbes aïllades i prou separades (entre 50-100 clapes per placa)
- Realitzar les rèpliques en nitrocel·lulosa de les plaques, i hibridar-les com en els passos anteriors.

Es realitzaran tantes rondes de *screening* fins que aconseguir purificar a homogeneïtat els clons positius, de manera que aconseguim que totes les calbes d'una placa donin senyal positiva d'hibridació. Normalment amb 3-5 rondes de crivellatge ha estat suficient per aïllar els fags recombinants positius, segons el cas.

Conservació d'estocs de bacteriofag lambda

Els lisats de fag (preferiblement de placa) es conserven a -70°C amb la presència de DMSO al 7% (v/v). D'aquesta manera es poden conservar sense pèrdues significatives de viabilitat durant molts mesos. Alhora de recuperar els fags, punxar la superfície de l'estoc congelat amb una nansa de kolle al vermell viu, i escampar-la sobre l'agar d'un cultiu confluent (sembrat prèviament) de bacteris indicadors. Incubar tota la nit a 37°C per obtenir clapes de lisi fresques.

3.2. SCREENING D'UNA LLIBRERIA DE cDNA

S'ha utilitzat una llibreria comercial de cDNA en plasmidi, construïda a partir de cDNA de ronyó de ratolí. La llibreria ha estat proveïda en el sistema *HibriZAP™ Two-Hybrid* [STRATAGENE], i està construïda en el vector pAD-Gal4 (veure apartat 4 de materials). El DNA de la llibreria s'introdueix en bacteris (soca JM109 d' *E.coli*) i es sembren en plaques de Petri grans fins que s'assoleixi un nombre total de ~100.000 colònies independents, suficient per que els clons dels transcrits poc abundants hi estiguin també representats. Un cop sembrada la llibreria, es realitzen les rèpliques de les plaques en filtres circulars de nitrocel·lulosa, que seran hibridats amb sondes de DNA marcades radioactivament. Les colònies positives identificades d'aquesta manera, es piquen s'amplifiquen i es tornen a sembrar en plaques, ara petites, replicant-se de nou en filtres i rastrejant-se per hibridació amb la mateixa sonda. Amb successives rondes d'screening (de 3-5), es va enriquint en els clons positius candidats fins a aïllar-los completament purs

Reactius

- Plaques de Petri (LB-agar-ampicil·lina) de 150 mm i 90 mm de diàmetre
- Filtres circulars de nitrocel·lulosa de 132 mm de diàmetre [Duralose-UV™, STRATAGENE] i de petits [SCHLEICHER & SCHUELL]
- Solucions d'hibridació, de rentat, etc.

Procediment

Transformació i sembra de la llibreria

1. Titular la llibreria de cDNA original per tal d'estimar-ne la concentració de clons, i fer els càlculs necessaris per tenir aproximadament 1×10^5 colònies independents
2. Introduir el DNA de la llibreria (25 ng) per electroporació dins bacteris competents de la soca JM109 (veure apartat 4.2.)
3. Repartir la barreja de transformació en plaques grans amb antibiòtic (unes 20) incubant-les a 37°C o/n o fins que les colònies tinguin una grandària d'~1 mm
4. Retolar i emmagatzemar les plaques de la llibreria (en posició invertida) a 4°C

Replicació de les colònies en filtres de nitrocel·lulosa

5. Matenir les plaques a 4°C fins l'últim moment abans de realitzar les rèpliques, per tal de que l'agar i les colònies estiguin endurits
6. Marcar els filtres circulars i procedir a realitzar els *colony liftings*:
 - i) A la flama, començant pel centre de la placa i utilitzant guants i pinces, estendre amb molta cura la membrana de nitrocel·lulosa sobre la superfície de l'agar, evitant les bombolles d'aire

- ii) Deixar els filtres durant 2 min amb contacte amb les plaques per tal que les colònies bacterianes es transfereixin a la cara interior del filtre

- iii) Mentrestant, amb una xeringa amb tinta xinesa, puxar la placa tot travessant el filtre, per tal de realitzar unes marques asimètriques que permetin la seva posterior orientació

7. Desadherir de l'agar les rèpliques de *duralose*, procurant de no escampar les colònies i processar-les (amb la banda de les colònies cap amunt) de la següent manera:

- i) *lisi & desnaturalització*: disposar els filtres-rèplica 5 min en una safata sobre paper Whatman 3MM impregnat de NaOH 0,5 M /NaCl 1,5 M
- ii) *neutralització*: passar els filtres a una safata amb NaCl 1,5 M /Tris-Cl 0,5 M pH 7,4, mantenir-ls-hi 5 min
- iii) *esbandida*: aclarir els filtres en SSC 2x durant 5 min més, deixant assecat després les membranes cara amunt sobre paper Whatman 3MM

8. Fixar el DNA a les membranes al forn de fixació (UV Stratalinker™, STRATAGENE), 2 cops per

la banda del DNA i un per la cara reversa. Els filtres ja estan preparats per hibridar-los o poden enmagatzemar-se secs entre plecs de paper Whatman 3MM

Hibridació

9. Pre-rentats:

- i) Humitejar els filtres en SSC 2x durant 5 min amb agitació suau
- ii) Rentar els filtres 30 min a 50°C (dins una carmanyola amb agitació suau) amb:

SSC 5x
SDS 0,5 %
EDTA 1mM, pH 8,0

- iii) Eliminar la brutícia i els restes de colònies de sobre la superfície dels filtres amb l'ajut de cotó humitejat

10. *Pre-hibridació*: pre-hibridar els filtres (en carmanyola) de 2-3 h a 65°C en la solució següent:

SSC 6x
BLOTTO* 0,05x
poli(A)[†] a 1 µg/mL
*Blotto 1x: llet MOLICO al 5% (w/v)
+ azida sòdica 0,02% (w/v)

11. Marcar radioactivament amb fòsfor-32 la sonda de DNA amb que s'hibridarà els filtres (veure apartat 2.2.)

12. *hibridació*: hibridar els filtres de la llibreria o/n a 65°C (dins una carmanyola amb agitació constant) amb la mateixa solució del punt n° 10, però preparada de nou i amb el mínim volum de líquid possible

13. *Rentats*: realitzar els següents rentats, dins una carmanyola i amb volums grans de solució (mantenint una agitació vigorosa)

- i) Quatre rentats de 5 min amb SSC 2x /SDS 0,1%
- ii) Un rentat de 60 min a 65°C amb SSC 1x /SDS 0,1%
- iii) Un rentat addicional de 60 min a 65°C (si encara quedés *background* als filtres) amb SSC 0,2x /SDS 0,1%

14. Autoradiografia:

un cop s'han completat els rentats, s'escorre breument l'excés de líquid dels filtres-rèplica sobre paper de filtre i seguidament (sense deixar que s'assequin en cap moment), s'embolcallen en plàstic transparent. Els filtres radioactius, s'exposen front de films autoradiogràfics (kodak X-OMAT, KODAK) a -80°C dins de cassettes amb pantalles intensificadores, entre poques hores i varis dies, segons la senyal estimada amb un comptador Geiger-Müller.

3.3. REPLICACIÓ DE PLAQUES BACTERIANES SOBRE MEMBRANES

S'han utilitzat dos mètodes –ambdós descrits a [284]– per replicar colònies bacterianes en filtres de nitrocelulosa o en filtres de *nylon*.

En el mètode I es transfereixen moltes colònies simultàniament des de la superfície de plaques d'agar cap a filtres-rèplica; s'ha utilitzat en els primers estadis del *screening* de la llibreria d'expressió, en el quan s'han de rastrejar un elevat número de colònies per hibridació.

El mètode II s'utilitza quan fou necessari realitzar el *screening* d'un número reduït de colònies bacterianes disperses en varies plaques. Cadascuna de les colònies es repica repartint-la entre una placa "Master" d'agar i a sobre d'un filtre circular disposat sobre la superfície d'una segona placa d'agar. Després d'un període de creixement, les colònies es lisen *in situ* de la mateixa manera descrita en el protocol del tractament dels filtres-rèplica. Les plaques "master" es guardaren a 4°C fins que es disposà del resultat del *screening*. Quan varen aparèixer colònies positives, es recorregué a, es recorregué a aquestes plaques "master" per recuperar aquestes colònies.

Reactius:

- Plaques de LB-agar amb ampicil·lina (a una concentració de 100 µg/mL)
- Xeringa d'insulina; tinta xinesa (millor blava o vermella que negra)
- Membranes circulars de nitrocel·lulosa reforçada de 82 mm de diàmetre [Duralose-UV™ membranes, STRATAGENE]
- Membranes circulars de *nylon* (82 mm de diàmetre), [Duralon-UV™ membranes, STRATAGENE]
- Safates metàl·liques o de vidre; Paper WHATMAN 3MM

Procediments:**MÈTODE I**

1. Sembrar les bactèries en plaques d'LB-agar/ampicil·lina, a una dilució en la qual s'obtinguin colònies individuals aïllades i ben identificades.
2. Incubar les plaques overnight a 37°C fins a permetre que les colònies bacterianes creixin fins a una mida visible (aproximadament 1mm de diàmetre).
3. Mantenir les plaques a 4°C per tal de que s'endureixi l'agar prèviament a la realització de les rèpliques.
4. Començant pel centre de la placa i utilitzant guants i pinces, estendre cuidadosament la membrana de nitrocel·lulosa sobre la superfície de la placa d'agar, evitant les bombolles d'aire. Un cop el filtre ha contactat plenament amb tota l'extensió de l'agar, no desplaçar ni reajustar el cercle de duralosa per tal de no escampar les colònies de sota.
5. Deixar els filtres durant 2 min en contacte amb les plaques per tal que les colònies bacterianes es transfereixin a la cara interior del filtre.
6. Mentrestant, mitjançant una agulla, encaixada en una xeringa plena de tinta xinesa, punxar la placa atravesant la membrana, per tal de realitzar unes marques asimètriques que permetran el posterior alineament entre el filtre-rèplica i la placa-model corresponent.
7. Un cop transcorreguts els dos minuts, desadherir de l'agar les rèpliques de nitrocel·lulosa, mitjançant un lent moviment continu, procurant de no escampar les colònies.
8. Processar els filtres tal com es descriu en el protocol Tractament dels filtres rèplica.

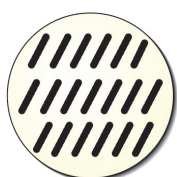
MÈTODE II

FIG 35. Esquema dels streaks realitzats sobre membranes de nitrocel·lulosa.

1. Disposar els filtres de *Nylon* sobre plaques d'agar amb antibiòtic selectiu
2. Utilitzant puntes de micropipeta estèrils, picar cada colònia individual, fent una ratlleta sobre el filtre (tal com s'indica a la figura 35) i llavors una altre sobre una placa d'agar amb ampicil·lina (que esdevindrà la placa "master"). Cada colònia s'haurà de replicar en una posició idèntica en les dos plaques
3. Incubar les plaques o/n a 37°C
4. Guardar les *master plates* a 4°C en posició invertida. processar els filtres tal com es recomana en el punt del procediment I anterior

Tractament dels filtres-rèplica

Un cop realitzats els *lifts*, cal tractar els filtres per tal d'alliberar, exposar i desnaturalitzar el DNA present en les colònies bacterianes, com a pas previ a la hibridació amb dels filtres amb sondes radioactives.

Reactius:

- *Streaks* bacterians realitzats sobre filtres de *nylon* (mètode I) o filtres rèplica de colònies (realitzats amb el mètode II)
- NaOH 0.5 M / NaCl 1.5 M
- Tris-Cl 0.5 M; pH 7.4 / NaCl 1.5 M
- Safates metàl·liques o de vidre PIREX; Paper WHATMAN 3MM
- SSC 2x

Procediment:

1. Preparar 3 safates amb varies fulles apilades de paper WHATMAN 3MM al fons. Humitejar les fulles de paper de dins, fins a saturar-les de líquid –evitant l'excés de fluid– amb les següents solucions:
 - i) Tampó de lisi/desnaturalització (NaOH 0.5 M/NaCl 1.5 M)
 - ii) Tampó de neutralització (Tris-Cl 0.5 M; pH 7.4/NaCl 1.5 M)
 - iii) Solució d'esvandida (SSC 2x)
2. Disposar els filtres-rèplica –amb la banda de les colònies cara amunt– sobre els papers humits de la primera safata durant 5 min. pasar-los a la safata següent.
3. Exposar cada filtre de la mateixa manera, a la solució neutralitzadora durant 5 min.
4. Transferir els filtres a sobre del paper saturat de tampó de a la tercera safata, manteni'ls-hi 5 min més.
5. Deixar assecar les membranes a sobre de paper WHATMAN 3MM sec amb la cara del DNA amunt.
6. Fixar el DNA “crosslinkant-lo” en el forn de fixació (UV Stratalinker™ 1800, [STRATAGENE]) 4 min per la cara que conté el DNA i 2 min per l'altra.
7. Els filtres ja estan preparats per hibridar-los o poden enmagatzemar-se secs entre plecs de paper WHATMAN 3MM.

Hibridació i *screening* dels dels filtres-rèplica

Protocol d'hibridació per rèpliques de colònies o de *streaks* (de plaques bacterianes) realitzades en filtres circulars de nitrocelulosa

Reactius

- Solució de pre-rentat: SSC 5x, EDTA 1 mM
- Solució de pre-hibridació/hibridació:
 - SSC 6x
 - BLOTTO 0,05x
 - (BLOTTO 1x: llet en pols *Molico* al 5 % (w/v),
 - azida sòdica 0,02% (w/v)
 - poli (A) a 1 µg/mL [BOEHRINGER MANHEIM]
- Tampó de rentat 1:
 - SSC 2x, SDS 0,1 % (w/v)
- Tampó de rentat 1:
 - SSC 2x, SDS 0,1 % (w/v)
- Tampó de rentat 2:
 - SSC 1x, SDS 0,1 % (w/v)
- Tampó de rentat 3:
 - SSC 0,2x, SDS 0,1 % (w/v)
- SSC 2x

Procediment

Pre-rentat

1. Submergir els filtres circulars en SSC 2x; agitació suau 5 min
2. Traspasar el filtres a un altre recipient que contingui solució de pre-rentat; incubar-los 30 min a 50°C
3. Eliminar suament la brutícia i els restes de les colònies de la superfície dels filtres

Pre-hibridació

4. Pre-hibridar els filtres amb la solució de pre-hibridació de 2-4 h a 65°C; mantenir una agitació constant

Hibridació

5. Desnaturalitzar la sonda, bullint-la 5 min a 100°C, clavar en gel

6. Afegir la sonda marcada radioactivament a la solució. S'utilitzen $0,5 \times 10^6$ cpm/mL de tampó d'hibridació (és el mateix que l'utilitzta per pre-hibridar)
7. Hibridar o/n a 65°C amb agitació

Rentats

8. Els rentats es varen fer en carmanyola i amb volums grans de solució
 - i) 4 x 5 min a temperatura ambient amb tampó de rentat 1
 - ii) Un rentat de 60 min a 65°C amb el tampó de rentat 2
 - iii) Un rentat addicional (si encara queda background als filtres) de 60 min a 65°C amb el tampó de rentat 3

Autoradiografia:

Un cop s'han completat els rentats, s'escorre breument l'excés de líquid dels filtres-rèplica sobre paper de filtre i seguidament -sense deixar que s'assequin en cap moment-, s'embolcallen en plàstic d'embolicar transparent. Els filtres s'exposaren front un film autoradiogràfic [X-OMAT, KODAK] a la temperatura de -80°C , dins d'un casette de raigs X amb pantalla intensificadora. Si la senyal dels filtres en un comptador de Geiger-Müller era considerable, s'exposaren durant 3-4 h, en el cas de que donessin poca senyal es van deixar exposant un o/n.

Deshibridació de Membranes

Per tal de re-utilitzar els filtres de les llibreries, northern o southern-blots, cal eliminar primer la sonda radioactiva enganxada al filtre, abans de poder tornar-los a hibridar amb d'altres sondes. En general els filtres s'han reutilitzat, segons el cas, fins a un total de 7 vegades. Per deshibridar s'ha seguit el següent protocol per tots ells:

1. Abocar un volum gran de SDS 0,1% bullent sobre els filtres
2. Mantenir-los-hi durant 15 min. Treure'ls i deixar-los assecar sobre paper de filtre
3. Si els filtres encara donessin senyal, repetir els passos 1-2 un cop més.

Els filtres deshibridats, un cop secs, es poden guardar entre fulles de paper Whatman 3MM fins que no s'hagin d'utilitzar de nou.

4. DNA RECOMBINANT

4.1. CLONATGE I SUBCLONATGE DE DNA

Clonatge estàndard de DNA

A part del clonatge de productes generats per PCR (en el qual s'han fet servir mètodes específics), en el cas de la construcció de clons recombinants s'ha partit de DNA digerit i purificat a partir d'agarosa, utilitzant-se tècniques estàndard de biologia molecular per clonar fragments de DNA dins de vectors plasmídics. Tan el DNA a clonar ("l'insert") com el DNA plasmídic acceptor del fragment ("el vector"), s'han obtingut en quantitats suficients en sengles digestions diagnòstiques. Sempre que ha estat possible s'han escollit enzims de restricció adequats que generessin extrems compatibles. L'estratègia general és la següent:

- 1) Preparació del vector i de l'insert (digestió, defosforilació, etc.)
- 2) Purificació dels fragments a clonar i del vector
- 3) Lligació
- 4) Transformació de bacteris competents
- 5) Identificació de les colònies recombinants

Defosforilació del vector

En el cas d'haver utilitzat un sol enzim, per prevenir la recircularització del vector durant la lligació, caldrà prèviament defosforilar-lo. S'ha utilitzat l'enzim comercial fosfatasa alcalina de ROCHE (originària d'intestí de vedella).

El protocol de defosforil·lació és el següent:

1. Digerir el plasmidi (~10 µg) i comprovar que s'hagi assolit una digestió completa
2. Procedir a la defosforilació afegint al tub:
 - 1/10 del volum de 10x CIAP *buffer*
 - 1 µL (1U) de l'enzim CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*)
3. Barrejar i incubar 60 min a 37°C
4. Inactivar tèrmicament la fosfatasa 15 min a 65°C

Farciment d'extrems protuberants en 5' (Fill-in)

En el cas de que interressi convertir un extrem sobresortint en un extrem esmussat es pot realitzar un farciment de l'extrem 5' en qüestió amb el fragment *Klenow* de la DNA polimerasa I d'*E.coli* (s'ha utilitzat l'enzim subministrat per ROCHE). La reacció pot realitzar-se a continuació de la digestió enzimàtica (havent inactivat tèrmicament les endonucleases de restricció) i prèviament a la purificació final.

El protocol és el següent:

1. Muntar la reacció de *fill-in* (en un volum final de 20 µL):
 - 10 µL del fragment de DNA (0,1-1 µg) a farcir
 - 1 µL de dNTPs (barreja dels 4 tipus de nucleòtids) a 0,5 µM
 - 2 U de l'enzim *Klenow*
 - H₂O destil·lada fins a 20 µL
2. Incubar 30 min a 37°C
3. Aturar la reacció escalfant 10 min a 75°C

Lligació entre vector i l'insert

Un cop realitzades les modificacions pertinents de vector i d'insert s'ha procedit a purificar-los a través d'electroforesi preparativa; els fragments d'interès s'han extret del gel i purificat utilitzant el protocol d'extracció d'àcids nucleics a partir d'agarosa (secció 1.6.). Abans de realitzar la lligació s'estima la concentració aproximada de DNA i es calcula la quantitat molar de vector (V) i de insert (I) a combinar (normalment sol utilitzar-se una relació molar I:V de 3:1). Tan si es tracta de lligacions entre molècules de DNA amb extrems cohesius o amb extrems esmussats, s'ha fet servir el següent protocol:

1. Disposar la següent reacció en un microtub de paret fina:

Quantitat	Component
fins a 10 μL	H ₂ O <i>milliQ</i>
1 μL	10x T4 DNA ligase buffer*
Y $\mu\text{L}^\dagger$	~100 ng de Vector (digerit i defosforilat si s'escau)
X $\mu\text{L}^\dagger$	DNA de l'insert
1 μL	T4 DNA lligasa* a 3 U/ μL

*PROMEGA

[†]La quantitat dependrà de la relació molar utilitzada. pot utilitzar-se la següent formula:

$\frac{\text{quantitat de V (ng)} \times \text{mida I (kb)}}{\text{grandària del V (kb)}} \times \frac{\text{ratio molar}}{\text{molar}} = \text{ng de I}$
--

2. Incubar la reacció tota la nit a 16°C
3. Aturar la reacció congelant a -20°C o procedir a la transformació.

Clonatge de productes de PCR

En el cas dels productes de PCR, l'estratègia de clonatge ha estat basada en el fet de que certes polimerases termostables com la *Taq* o la *Tfl* sovint afegeixen una única desoxiadenosina extra als extrems 3' de les cadenes amplificades (activitat adenosina transferasa 3' terminal). Aquesta característica s'aprofita en una sèrie de vectors comercials, que presenten una desoxitimidina terminal a cada un dels seus extrems 3' (solen estar linearitzats), de manera que llurs extrems són compatibles amb els del producte a clonar, incrementant-se doncs l'eficiència de la lligació.

S'han utilitzat fonamentalment dos kits comercials alhora de clonar productes de PCR: el *pGEM®-T Vector Systems* de PROMEGA, i el *TOPO-cloning* de la casa INVITROGEN. Cal esmentar que el segon d'ells ha ofert un rendiment molt superior en l'obtenció de clons recombinants i ha estat el sistema d'elecció en l'última època del treball. En qualsevol cas, el clonatge dels productes, utilitzant els kits i vectors que sigui consta de les següents etapes elementals:

- i) Preparació de l'insert a clonar
- ii) Lligació entre el vector de clonatge i l'insert
- iii) Transformació dels productes de la lligació en bacteris competents
- iv) Anàlisi dels clons resultants

Preparació de l'insert

Els fragments de DNA s'han de purificar prèviament. Si el fragment a clonar d'interès prové d'una PCR on s'han generat altres productes no desitjats, s'ha procedit a resoldre electroforèticament tots els productes, retallant

del gel la banda desitjada. Aquesta banda extreta del gel d'agarosa s'ha purificat segons els protocols descrits en l'apartat Purificació de DNA a partir de gels (veure pàg 116)

En el cas de que el producte de PCR sigui únic (apareixerà en forma d'una sola banda ben definida al córrer-la en un gel), el DNA de la reacció es pot purificar directament del tub sense haver de separar-ne elctroforèticament els seus productes. S'ha utilitzat *kits* comercials de purificació de reaccions de PCR (veure apartat 1.7.) d'acord amb les instruccions dels proveïdors.

Lligació del vector amb l'insert

A) En el cas d'utilitzar el vector pGEM-T o el seu derivat pGEM-T Easy (veure apartat vectors de la seccio MATERIALS, pàgina 100), la reacció de lligació ha estat la descrita a continuació:

1. Constituir la següent reacció en un microtub de 0,5 mL:

Quantitat	Component	V_{final} 20 μ L
fins a 10 μ L	H ₂ O <i>milliQ</i>	
1 μ L	10x T4 DNA ligase buffer*	
1 μ L	pGEM®-TopGEM®-TEasy* (50 ng)	
X μ L†	producte de PCR	
1 μ L	T4 DNA lligasa* a 3U/ μ L	

* Subministrats amb el kit

† Cal optimitzar la ratio insert/vector; normalment s'ha utilitzat una relació molar de 3:1

2. Barrejar amb l'ajut de la micropipeta mitjançant aspiració i buidat. Incubar la reacció *o/n* a 4°C
3. Guardar la lligació congelada a -20°C fins a la seva utilització

B) En el cas d'haver utilitzat el kit TOPO-CLONING, similar al sistema anterior basant-se en el sistema "T-A", però en aquest, el vector receptor pCR2.1-TOPO esta activat amb la Topoisomerasa I unida covalentment en els seus extrems, el que permet una reacció de lligació molt ràpida i eficient. El protocol de lligació ha estat els següent:

1. En un microtub de 0,5 mL, combinar els següents components:

Quantitat	Component	V_{final} 20 μ L
fins a 6 μ L	H ₂ O estèril**	
0,5-4 μ L	producte de PCR‡	
1 μ L	Salt solution**	
1 μ L	Vector TOPO®*	

** Subministrats amb el kit

‡ No cal que estigui purificat, pot ser producte fresc directament del tub de PCR

2. Barrejar lleugerament. Incubar la reacció de 5-10 min a temperatura ambient (22-23°C)
3. Guardar la lligació congelada a -20°C fins a la seva utilització.

4.2. TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS

Preparació de bacteris competents per electroporar

L'obtenció de bacteris competents per electroporar s'ha realitzat seguint les instruccions detallades en el manual de l'aparell d'electroporació. S'ha utilitzat la soca JM109 d'*Escherichia coli* que es especialment útil per a ser transformada mitjançant electroporació. El protocol per preparar bacteris competents es el descrit a continuació.

Reactius

- Glicerol al 10 % (v/v)
- Plaques de LB-agar
- H₂O destil·lada estèril
- Cubetes d'electroporació [BIO-RAD]
- Medi SOC [GIBCO]

Procediment:

1. Créixer un *streak* de la soca d' *E. coli* JM109 o/n a 37°C, en una placa d'LB sense antibiòtic
2. El dia següent, picar una colònia aïllada de la placa i preparar un minicultiu líquid de 3 mL de LB (o/n)
3. L'endemà a primera hora, prendre 1 mL del cultiu fresc de nit i inocular un erlenmeyer gran amb 500 mL de medi LB. Incubar-lo a 37°C amb agitació vigorosa (225 rpm) durant 4-5 h fins que el cultiu assolixi la fase exponencial ($A_{595} \sim 0,7-0,8$)
4. Deixar els bacteris en gel durant 15 min
5. Centrifugar a 3.500 rpm durant 15 min (4°C), descartar el sobrenedant
6. Resuspendre el *pellet* bacterià en 500 mL d'H₂O destil·lada estèril (a 4°C)
7. Centrifugar de nou com en el pas n° 5
8. Decantar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 250 mL d'aigua destil·lada estèril freda. Repetir el pas n° 5
9. Resuspendre els bacteris en 10 mL de glicerol al 10 % estèril a 4°C
10. Centrifugar com en el pas n° 5
11. Resuspendre acuradament el *pellet* final bacterià en un volum de 1-2 mL de glicerol al 10 % fred
12. Al·líquotar els bacteris resuspesos en al·líquotes de 40 µL i congelar-les ràpidament en un bany d'acetona/neu carbònica. Conservar els tubs a -80°C

Electroporació

L'electroporació és el mètode que ofereix majors eficiències de transformació. S'han utilitzat cubetes d'electroporació de 0,2 cm i l'aparell *Gene™ Pulser* de BIO-RAD. El protocol i els paràmetres de l'experiment han estat els subministrats pel fabricant, resumidament:

1. Descongelar les al·líquotes de bacteris competents (40 µL), mantenir-les sempre en gel
2. Afegir a una al·líquota de bacteris 1-3 µL de lligació (o si no, ~50 ng de DNA), incubar 1 min en gel
3. Transferir la barreja a la cubeta de l'electroporador prèviament refredada en gel
4. Condicions de l'aparell:

Resistència	200 Ω
Capacitància	25 µF
Voltatge	2,5 kV
5. Realitzar el puls amb els paràmetres seleccionats
6. Afegir a la cubeta 1 mL de medi SOC i resuspendre en ell ràpidament els bacteris. Incubar 45 min a 37°C amb agitació forta
7. Sembrar una al·líquota de 100 µL en plaques de medi selectiu, que permeti identificar els transformants.

Transformació per xoc tèrmic

La transformació de bacteris competents per xoc tèrmic s'ha utilitzat quan no calia obtenir una gran eficiència (al transformar directament amb plasmidis superenrotllats) o quan s'utilitzaven els bacteris *One-Shot® TOP10* d'*E. coli*, de la casa comercial INVITROGEN, fets competents químicament i que ofereixen una eficiència de transformació de 10^7-10^8 cfu/µg.

El protocol ha estat el següent:

1. Afegir 2 µL de la reacció de lligació TOPO (apartat 4.1.) o de 2-5 µL d'una lligació tradicional (veure pàgines 143-144) als bacteris competents, tot en gel
2. Incubar un mínim de 30 min en gel
3. Realitzar el xoc tèrmic: incubar les cèl·lules 30 s a 42°C

4. Transferir immediatament els tubs en gel
5. Afegir 250 μL de medi SOC prèviament temperat a 37°C
6. Incubar a 37°C horitzontalment amb agitació forta (200-225 *rpm*), durant 1 h
7. Sembrar la meitat o tota la barreja en plaques de LB amb medi selectiu. Incubar o/n a 37°C.

1.2.x. MAPATGE D'HÍBRIDS PER RADIACIÓ

Panel de ratolí

S'ha utilitzat el panel comercial WGRH de ratolí/hàmsster T31 de Goodfellow¹, de la casa comercial RESEARCH GENETICS. El panel ha estat generat fusionant cèl·lules primàries d'embrió de ratolí (129aa), amb cèl·lules de hàmsster. Concretament, les cèl·lules murines van ser primer irradiades amb 3.000 *rad* i fusionades amb la línia de hàmsster A23, deficient en timidina quinasa. El panel consta de 100 clons + 2 controls, amb un percentatge de retenció estimat de genoma de ratolí del 20-25 %.

Per mapar el gen *Oatp-d/mjam* en ratolí, s'han utilitzat la següent PCR i els següents primers:

Primers	Seqüència
<i>mOatp-d RH1f</i>	5' -GGCAGAGATGGGATTGTGT-3'
<i>mOatp-d RH1r</i>	5' -TGCTCCAGAACAGACAGGTG-3'
Mida del producte amplificat:	238 bp

Reacció i condicions de la PCR:

Quantitat	Component		
V_{final} 20 μL	10,3 μL	H ₂ O destil·lada	1) 94°C 8 min
	1 μL	DNA genòmic de cada clon de RH (25 ng)	2) 94°C 30 s
	2 μL	10x <i>EcoTaq</i> buffer [*]	3) 62,5°C 30 s
	0,6 μL	MgCl ₂ 50 mM	4) 72°C 25 s
	1,6 μL	dNTP mix 2,5 mM	5) Repetir 30 vegades els passos 2-4
	2 μL	<i>forward primer</i> 10 μM	6) 72°C 5 min
	2 μL	<i>reverse primer</i> 10 μM	7) 4°C ∞
	0,5 μL	<i>EcoTaq</i> (2,5 U totals)	

*Subministrats amb el *kit*

Es realitza les PCR corresponents utilitzant com a motlle cada un dels clons, i a continuació es corre un gel diagnòstic d'agarosa al 2%, anotant-se tots aquells clons on s'ha produït amplificació (*i.e.* presència d'una banda de mida adequada). S'ha fet servir el termociclador *Perkin Elmer genamp 9600*, que permet realitzar en paral·lel 96 reaccions en el mateix programa. Per confirmar els resultats, totes les reaccions s'han repetit 2 vegades.

Refs:

¹McCarthy, L.C., Terrett, J., Davis, M.E., Knights, C.J., Smith, A.L., Critcher, R., Schmitt, K., Hudson, J., Spurr, N.K., Goodfellow, P.N. (1997) A first-generation whole genome-radiation hybrid map spanning the mouse genome. *Genome Res* 7(12), 1153-61.

Panel de Rata

S'ha utilitzat el panell T-55 (comercialitzat per RESEARCH GENETICS), generat per la fusió d'una línia cel·lular de rata amb una línia de hàmsster. El panell ha estat generat per irradiació (3000 *rad*) de la línia RatFR, derivada de una biòpsia de pell fetal de rata *Sprague-dawley*, i fusió amb la línia receptora de hàmsster A23, deficient en timidina

kinasa. El panel consta de 106 clons + 2 controls, amb un percentatge de retenció de genoma de rata del 29%

Per mapar el gen *Oatp-d/mjam* en rata, s'han utilitzat la següent PCR i els següents primers:

Primers	Seqüència
<i>rOatp-d RH1 U</i>	5' -ACACACACGCACACAGGAAT-3'
<i>rOatp-d RH1 L</i>	5' -GCCACAAGTGTCCCTGAAT-3'
Mida del producte amplificat:	205 pb

Reacció i condicions de la PCR:

	Quantitat	Component		
V_{final} 20 μ L	10,3 μ L	H ₂ O destil·lada	1) 94°C	8 min
	1 μ L	DNA genòmic de cada clon de RH (25 ng)*	2) 94°C	30 s
	2 μ L	10x <i>EcoTaq</i> buffer	3) 62,5°C	30 s
	0,6 μ L	MgCl ₂ 50 mM	4) 72°C	25 s
	1,6 μ L	dNTP mix 2,5 mM	5) Repetir 30 vegades els passos 2-4	
	2 μ L	forward primer 10 μ M	6) 72°C	5 min
	2 μ L	reverse primer 10 μ M	7) 4°C	∞
	0,5 μ L	<i>EcoTaq</i> (2,5 U totals)		

*Subministrats amb el kit

Múltiples PCR es van realitzar simultàniament en plaquetes de PCR de 96 pous [PERKIN ELMER], al termociclador *PCR multiamp 9600*. Un cop realitzada la PCR, s'afegia a cada tubet 2 μ L de 10x *loading buffer* i es corria l'integritat de la reacció en un gel gran d'agarosa al 2%, fins que s'hagin separat bé les bandes.

6. CULTIUS CEL·LULARS I TRANSFECCIONS

6.1. CULTIUS CEL·LULARS

Línies i medis de cultiu

Les línies cel·lulars* utilitzades en aquest treball han estat les següents:

<u>Renals</u>		<u>No Renals</u>
PCT3	CV-1	HepG2
PR10	HEK293	
MDCK		

Totes les línies cel·lulars amb les que s'ha treballat han estat mantingudes i expandides a 37°C en un incubador amb atmosfera humida (al 5% en CO₂), seguint els procediments i les pràctiques estàndard requerides pel treball amb cultius en condicions estèrils [277].

*(veure apartat de materials, pag 97)

Tripsinització

Les plaques de cultiu s'han tripsinitzat cada 3-4 dies aproximadament, segons la velocitat de creixement particular de cada línia cel·lular. En general es recomana realitzar el procés de tripsinització quan el cultiu ha assolit un 80-90% de confluència, assumint de que es tracta de línies que creixen de forma adherent sobre suport sòlid.

Reactius

- PBS 1x estèril
- Tripsina-EDTA (al 0,05 %) [BIOLOGICAL INDUSTRIES]
- Medi de cultiu adequat

Procediment

1. Temperar la tripsina, el PBS i el medi de cultiu stock a 37°C
2. Aspirar el medi de les cèl·lules amb una pipeta pasteur de vidre estèril
3. Rentar la monocapa de cèl·lules dues vegades amb PBS 1x (a 37°C)
4. Retirar el PBS 1x de la placa i afegir la solució de tripsina:
2,5 mL / placa T-25 (25 cm² d'àrea)
5. Incubar de 5-10 min a 37°C, dins l'incubador de cultius
6. Controlar el procés al microscopi invertit: quan les cèl·lules comencen a estar refringents i desadherint-se del plàstic ja es pot aturar el procés
7. Neutralitzar la tripsina afegint un volum idèntic de medi de cultiu (a 37°C)
8. Acabar de desenganxar les cèl·lules colpejant –si cal– suaument la placa i aspirar la suspensió resultant amb un a pipeta estèril de 10 mL estèril
9. Centrifugar les cèl·lules 5 min a 1000 rpm (4°C)
10. Descartar el sobrenedant de medi/tripsina i resuspendre el *pellet* cel·lular resultant amb un volum de medi adequat (normalment 1-2 mL)
11. Sembrar les cèl·lules en una nova placa, a la dilució desitjada (normalment a una densitat de 100.000 cèl. / placa T-25)

Recompte de cèl·lules

Un cop s'ha tripsinitzat i cal resembrar de nou les cèl·lules, s'ha de determinar prèviament la seva concentració aproximada per poder sembrar-les a la densitat desitjada. El protocol de comptage és el següent:

Reactius

- Blau de Tripà [SIGMA]

- Càmera de comptatge de Neubauer

Procediment

1. Prendre una alíquota de la suspensió de cèl·lules tripsinitzades i preparar una dilució 1:20 en blau de tripà
2. Omplir la càmera de Neubauer amb la dilució preparada, comptar el número de cèl·lules viables –les no tenyides– en diferents camps i realitzar el càlcul següent:

$$n^{\circ} \text{ cèl. / mL} = n^{\circ} \text{ cèl. promig (per camp)} \times 20 \times 10^4$$

3. Un cop fet el càlcul, agafar el volum necessari de suspensió cel·lular per sembrar la densitat desitjada.

Conservació de cèl·lules

Les cèl·lules eucariotes es poden conservar durant molt de temps congelades – en un medi criopreservant i a temperatura de nitrogen líquid– sense una gran pèrdua significativa de viabilitat. El protocol de congelació (per els línies PCT3 i PR10) és el següent:

Reactius:

- Dimetilsulfòxid (DMSO) [SIGMA]
- Criotubs de 1,5 mL

Procediment:

1. Tripsinitzar el cultiu cel·lular que tot just hagi arribat a confluència i resuspendre'l en 1 mL de medi complet; comptar el nombre de cèl·lules
2. Refredar en gel criotubs estèrils amb 100 μ L de DMSO a l'interior, fins que aquest últim solidifiqui
3. Afegir 900 μ L de la suspensió cel·lular ($0,5-1 \times 10^6$ cèl·lules totals) als criotubs prèviament refredats en gel
4. Barrejar immediatament les suspensió amb el DMSO fins que s'hagi liquat
5. Congelar de seguida a -20°C –ja que el DMSO pot ser tòxic per les cèl·lules a temperatures superior.
6. Al cap d'unes hores transferir els vials de crioconservació a -80°C
7. Conservar indefinidament les cèl·lules dins un tanc de N_2 líquid.

Descongelació de cèl·lules

Així com el procés de congelació ha de ser lent i gradual per no danyar les cèl·lules, el procés de descongelació ha de ser ràpid per tal de no perdre viabilitat.

Procediment:

1. Treure les cèl·lules congelades del N_2 líquid i descongelar-les en un bany a 37°C fins que s'hagin descongelat (però no del tot)
2. Afegir llavors –gota a gota– 1 mL de medi de cultiu fred (a 4°C) dins el vial que conté les cèl·lules
3. Agitar suaument la barreja i transferir-la a un tub amb 8 mL de medi de cultiu a 4°C
4. Centrifugar 5 min a 1000 *rpm* (4°C)
5. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* cel·lular amb un volum de medi adequat
6. Sembrar la totalitat de cèl·lules resuspeses en una placa de cultiu

6.2. DEPLECIÓ DEL SÈRUM FETAL D'ESTEROIDES

El sèrum boví fetal que s'ha utilitzat normalment per preparar els medis de cultiu, pot contenir, entre moltes d'altres substàncies, tota una sèrie d'hormones esteroïdals com andrògens, estrògens, glucocorticoides, etc. Per realitzar els estudis d'inducció amb andrògens, ens caldrà doncs eliminar-los prèviament del medi. Podem depletar selectivament del sèrum aquelles molècules de caràcter fortament hidrofòbic com les de natura esteroïdal, adsorbint-les sobre la superfície de partícules de carbó actiu, per preparar sèrum fetal boví deplecionat d'hormones esteroïdals, es segueix el següent protocol:

Reactius

- Sèrum fetal inactivat tèrmicament
- H_2O -DEPC
- Carbó actiu (Carchoal)

Procediment

1. Barrejar 50 mg de Carchoal per cada mL de sèrum a tractar
2. Incubar amb agitació orbital durant 30 min a temperatura ambient
3. Centrifugar 10 min a 12.000 rpm per sedimentar-ne el carbó actiu
4. Esterilitzar el sèrum deplecionat resultant passant-lo a través d'un filtre de $0,22 \mu m$ [MILLIPORE]
5. Conservar a $-20^\circ C$

6.3. CONSTRUCCIÓ DE PLASMIDIS REPORTERS RECOMBINANTS

Totes les construccions plasmídiques han estat generades utilitzant els mètodes estàndard de biologia molecular i DNA recombinant. Per obtenir els diferents fragments del promotor murí del *cyp4b1*, es van dissenyar primers adients amb els quals es va amplificar i subclonar posteriorment dins el vector pGL3basic –que codifica pel gen reporter luciferasa. Concretament, per les amplificacions es van utilitzar varis *primers forward* amb una diana *NcoI* inclosa en el seu extrem 5', i com a *primer reverse* s'utilitzà en totes les reaccions el *primer mCyp4b1 103L* (nt +62 a +82). Com a motlle de les reaccions s'utilitzà el fragment major de promotor clonat i la polimerasa triada fou la *Pfu turbo*® (STRATAGENE) per evitar introducció d'errors. Els fragments de promotor sintetitzats mitjançant PCR van ser digerits amb l'enzim *NcoI* (que tallava a l'extrem del primer i en una posició 3' interna, a +17), purificats i lligats dins del vector pGL3-basic [PROMEGA] obert amb *NcoI* i defosforilat. Es van analitzar les colònies recombinants

obtingudes seleccionant els clons en els quals l'orientació del promotor era l'adequada (*i.e.* en sentit *directe* respecte el gen de la luciferasa). S'han generat un total de 8 construccions reporteres quimèriques (veure llistat annex) més una d'addicional que conté el fragment major de 1,8 kb en orientació *reversa* respecte la luciferasa. L'orientació correcta i l'absència de mutacions es va verificar per seqüenciació.

TAULA XXI. Construccions *reporter* del promotor de *Cyp4b1*.

Nom	mida	posicions	orientació
-1,8/+32 <i>luc</i>	(~1,8 kb)	+32 / -1,8	(<i>reversa</i>)
-1,8 <i>luc</i>	(~1,8 kb)	-1,8 / +32	(<i>directe</i>)
-1,2 <i>luc</i>	(~1,2 kb)	-1,2 / +32	"
-1,02 <i>luc</i>	(~1,0 kb)	-1,02 / +32	"
-641 <i>luc</i>	(~0,64 kb)	-641 / +32	"
-256 <i>luc</i>	(~0,26 pb)	-256 / +32	"
-137 <i>luc</i>	(~137 pb)	-137 / +32	"
-98 <i>luc</i>	(~98 pb)	-98 / +32	"
-48 <i>luc</i>	(~48 pb)	-48 / +32	"

El plasmidi codificant pel receptor d'andrògens humà, pSV-AR₀ ja ha estat descrit amb anterioritat [285]. La construcció reportera 1xAREcyp98*luc*, utilitzada com a control positiu en les induccions androgèniques, s'ha generat

per inserció del oligonucleòtid doble cadena corresponent al element de resposta a andrògens (ARE) consens (en blau): GATCTG**AGAACATGATGTTCTG** en el lloc *Bgl*II del constructe *cyp98/+17luc*, i s'ha utilitzat com a control positiu de resposta a andrògens.

6.4. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA

La transfecció consisteix en l'introducció de DNA plasmídic dins de cèl·lules eucariotes. Existeixen diferents mètodes fisicoquímics per fer-ho, entre els que destaquem l'electroporació, el mètode de precipitació amb fosfat de calci, o la vehiculització del DNA en vesícules lipídiques. Segons el temps en que aquest material genètic extern estigui present dins de la cèl·lula, distingim entre transfecció transitòria (de 2 a 3 dies) i transfecció estable, en que mitjançant una pressió selectiva amb antibiòtic s'aconsegueix conservar-lo a dins constantment (durant molts mesos).

Per a l'introducció de DNA exògen transitòriament dins de cèl·lules en cultiu, s'ha utilitzat el mètode de transfecció per liposomes, concretament amb el producte LIPOFECTAMINE™ PLUS de la casa comercial LIFE TECHNOLOGIES, que és una barreja liposòmica (3:1) del lípid policatiònic *2,3-dioleiloxi-N-[2(sperminecarboxamido)etil]-N,N'-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetat* (DOSPA) i el lípid neutre *dioleil fosfatidiletanolamina* (DOPE); El reactiu PLUS s'acomplexa amb el DNA afavorint el seu empaquetat amb els liposomes i augmentant el rendiment de la transfecció, sovint el punt clau de tot el procés.

Cada línia cel·lular a transfectar requereix de l'optimització de les condicions de l'experiment, ja que el reactiu *lipofectamine* pot ser tòxic, a part de que l'eficiència de l'introducció del DNA pot variar molt segones les condicions, i ens interessa que sigui màxima. A continuació es descriu el protocol de transfecció transitòria optimitzat per les cèl·lules PCT3 i PR10, que són les línies amb que s'ha treballat més.

Reactius

- Lipofectamine [GIBCOBRL]
- Reactiu plus (“ ”)
- Medi OPTI-MEM® (“ ”)
- PBS 1x

Procediment

1. El dia previ a la transfecció, sembrar les cèl·lules en la placa de cultiu adequada, d'acord amb els valors de la taula XXII, per tal de que en el moment de ser transfectades hagin assolit un estat de confluència del 70-90%
2. Barrejar el DNA[†] amb el reactiu PLUS, segons les quantitats expressades a la Taula XXII, i ajustar els volums amb medi OPTI-MEM[‡]. Incubar 15 min a temperatura ambient
3. Diluir la lipofectamina en OPTI-MEM[‡]
4. Combinar la barreja de DNA-PLUS, i la lipofectamina preparada en el pas anterior, incubant-ho 15 min més a temperatura ambient
5. Aspirar el medi de cultiu habitual de les cèl·lules

TAULA XXII. Quantitats i volums de transfecció.

Mida de la placa	Cèl·lules a sembrar	DNA (μg)	PLUS (μL)	LIPOFECTAMINE (μL)	Volum final de transfecció (mL)
24 pous	60.000	0,3	1	1	0,250
6 pous	250.000	2,5	4	4	1,0
60 mm	0,5x10 ⁶	5	8	12	2,5
100 mm	1,5x10 ⁶	15	20	30	6,5

- i rentar-les dues vegades amb medi OPTI-MEM a 37°C
6. Afegir a les cèl·lules la barreja final de transfecció (volums finals indicats en la Taula XXII) i distribuir-la per tota l'extensió de la placa
 7. Incubar les cèl·lules amb els complexos DNA/lípids durant 3 h, a l'incubador de cultius (37°C sota atmosfera al 5% CO₂)
 8. Rentar les cèl·lules dos cops amb PBS 1x a 37°C,

i afegir-hi medi complet

9. Mantenir les cèl·lules a l'incubador, fins a realitzar els experiments adients (2-3 dies com a màxim).

[†]El DNA té que ser de la màxima puresa per evitar-ne la toxicitat. S'ha utilitzat plasmidis purificats amb obtingudes amb les columnes de nucleobond (veure apartat 1.3., pàg. 113)

[‡]Medi comercial sense antibiòtic i baix en sèrum de LIFE TECHNOLOGIES, els volums de barreja i dilució de cada pas, dependran de la grandària de la placa de cultiu utilitzada i estan indicats pel fabricant

Transfecció transitòria de construccions reporterres

Per a l'estudi de promotors *in vitro*, s'han utilitzat construccions d'aquests promotors fusionats a un gen reporter –luciferasa (Luc) en el nostre cas. Les cèl·lules són transfectades transitòriament, assajant-se l'activitat del gen reporter en els extractes cel·lulars 24-48 h després. Com a control intern per normalitzar les diferents eficiències de transfecció interplaca, s'ha utilitzat un plasmidi codificant per l'enzim fosfatasa alcalina secretada (SEAP), introduint-lo en el còctel de transfecció en una ratio molar vector-Luc/SEAP de 1:25, assajant-se llur activitat posteriorment (també al cap de 24-48h) en el sobrenedant del medi de cultiu dels pous.

Generalment s'han utilitzat plaques de 24 pous, transfectades de la manera descrita en l'apartat previ. Per cada construcció, s'han realitzat de 4-6 transfeccions.

L'esquema següent pot resumir-se de la següent manera:

DIA 0	Sembrar 60.000 cèl·lules/pou (placa de 24)
DIA 1	Transfectar amb les següents quantitats
0,3 µg totals de DNA/pou	
0,288 µg de cada Constructe- <i>Luc</i>	0,012 µg de pasmidi pSEAP-basic
DIA 2	Canvi dels medis de cultiu (afegir 0,5 mL / pouet)
DIA 3	Recollida de medis per mesurar l'activitat SEAP i recollida dels homogenats cel·lulars per assajar-hi l'activitat <i>Luc</i>

Quan es realitzen induccions i tractaments hormonals, cotransfectant amb el vector d'expressió del receptor d'andrògens humà, pSV-AR₀ o amb un plasmid irrelevant, el p*BlueScript*II (veure apartat MATERIALS, pàg. 100), el *time-course* seria el següent:

DIA 0	Sembrar 60.000 cèl·lules/pou (placa de 24), però en medi deplecionat d'hormones (veure aparta 6.2., pag 150)
DIA 1	Transfectar amb els següents còctels:

Situació AR -			Situació AR+		
0,45 µg totals de DNA / pou			0,45 µg totals de DNA / pou		
0,288 µg de cada Constructe- <i>Reporter</i>	0,012 µg de pasmidi pSEAP-basic	0,15 µg de plasmidi p <i>BlueScript</i> II	0,288 µg de cada Constructe- <i>Reporter</i>	0,012 µg de pasmidi pSEAP-basic	0,15 µg de plasmidi pSV-AR ₀

–Després de les 3h de transfecció s'afegeix medi condicionat (amb o sense andrògens, segons el cas)–

DIA 2 Canvi dels medis de cultiu (afegir 0,5 mL / pouet)

DIA 3 Recollida de medis per mesurar l'activitat SEAP i recollida dels extractes cel·lulars per assajar-hi l'activitat *Luciferasa*.

6.5. ASSAIGS DE GENS REPORTERS

Assaig d'activitat luciferasa

Per mesurar l'activitat luciferasa en homogenats cel·lulars, s'ha utilitzat el *kit* de PROMEGA, basat en l'utilització del substrat quimioluminiscent luciferina, que en presència d'ATP i altres cofactors és hidrolitzat per l'enzim produint llum, que és llegida en un luminòmetre de plaques. L'assaig és molt sensible i té un rang de linealitat molt ampli, que cobreix fins a quatre ordres de magnitud.

Reactius

- Components del *Kit* per necessaris per l'assaig:
 - CCLR 5x *buffer*
 - Substrat quimioluminiscent *luciferina* (arriba liofilitzat, es dilueix, s'alicuota i es guarda a les fosques a -80°C)
- Treure el buffer de lisi CCLR 5x de -20°C , i deixar-lo temperar a T^{a} ambient
- Diluir el 5x CCLR 1/5 amb H_2O milliQ
- Descongelar el substrat LAR (*luciferase assay reagent*), mantenir-lo en fred i protegit de la llum

Procediment

Habitualment es lisen les cèl·lules 48 h després d'haver-les transfectat transitòriament, havent realitzat un canvi de medi entremig a les 24 h. IMPORTANT: primer de tot recollir els medis de cultiu dels pous per fer l'assaig SEAP!

Preparació dels Lisats :

- | | |
|---|---|
| 1. Aspirar els medis de cultiu de cada pou. | amb una punta groga tallada (és viscos!), passar-ho a un <i>ependorf</i> . |
| 2. Rentar les cèl·lules 2 cops amb PBS 1x fred, aspirar-ho bé. | 6. Vortexar 15 seg els lisats cel·lulars. |
| 3. Afegir el <i>buffer</i> de lisi CCLR 1x ($175\ \mu\text{L}$ per pou de placa de 24) | 7. Centrifugar 30 seg a màxima velocitat |
| 4. Posar les plaques a l'agitador 'rocking' durant 10-30 min | 8. Transferir el sobrenedant a un nou tub eppendorf o alternativament col·locar-los ja en una placa de 96 pous. |
| 5. Rascar, en el nostre cas recollir la totalitat del lisat | 9. Guardar els tubs/plaques congelats a -80°C |

Assaig LUC quimioluminiscent adaptat a plaqueta de 96 pous

- Assagem $10\ \mu\text{L}$ de cada lisat amb $50\ \mu\text{L}$ de LAR (injectats pel luminòmetre)
- Prèviament s'haurà descongelat tan LAR com mostres tinguem (calculem $\sim 50\ \mu\text{L}$ /mostra i una mica més)

1. Descongelar els lisats cel·lulars i deixar-los temperar. Es disposarà 10 µL de cada lysat en una placa blanca opaca de luminòmetre, de 96 pouets [NUNC]
2. Carregar els injectors i preparar el luminòmetre:
3. (Paràmetres del programa: gain LOW; s'injecten 50 µL de substrat per pou, 2 s de delay i seguidament s'integra la senyal durant 15,0 s)

Assaig d'activitat SEAP

L'assaig de l'activitat fosfatasa alcalina secretada (SEAP) es realitza en els sobrenadants dels medis de cultiu, recuperats de les cèl·lules cotransfectades amb el vector pSEAP2-basic, que s'utilitzarà per normalitzar les diferents eficiències de transfecció entre pous. L'assaig es basa en una reacció enzimàtica catalitzada per la fosfatasa alcalina, en la qual s'hidrolitza un substrat quimioluminiscent (el CSPD™) amb l'emissió corresponent de llum, que serà registrada amb un luminòmetre.

Reactius:

- Kit *Great EscAPE™ SEAP Reporter system 3* [CLONTECH]
- Components del Kit per necessaris per l'assaig:
 - Tampó d'assaig
 - Tampó de dilució 5x
 - Substrat quimioluminiscent CSPD
 - Fosfatasa alcalina purificada (com a control positiu)
- Treure el kit de la nevera, deixar temperar a T^a ambient
- Diluir el Tampó de dilució 5x 1/5 amb H₂O milliQ

Procediment:

Recollida dels medis :

1. Habitualment es recullen els medis de cultiu 48 h després d'haver transfectat transitòriament les cèl·lules, havent realitzat un canvi de medi entremig a les 24 h aproximadament
2. Retirar 175 µL de medi de cada pou, passar a eppendorf
3. Centrifugar 15 s a màxima velocitat (13.000 rpm)
4. Transferir el sobrenedant (~100 µL) i passar-lo a un tub nou / o alternativament traslladar-ho a una placa de 96 pouets)
5. Guardar congelat a -80°C
4. Refredar les mostres breument en gel, deixant-les reequilibrar tot seguit a RT
5. Afegir a cada pou 40 µL de tampó d'assaig, remenar
6. Incubar 5 min
7. Mentrestant, preparar el substrat: diluir 1/20 el substrat CSPD amb *Chemiluminiscent enhancer* (mantenir-ho protegit de la llum)
8. Traspasar el contingut de cada pouet a la placa blanca de 96 pous per llegir-la al luminòmetre
9. Afegir 40 µL de substrat diluït a cada pouet, barrejar lleugerament. Tapar la placa amb paper de plata per mantenir-la a les fosques

Assaig SEAP quimioluminiscent adaptat a plaqueta de 96 pous

1. descongelar els medis de les transfeccions i deixar temperar a RT
2. En una placa de PCR de 96 pous afegir (per pouet):
10 µL medi + 30 µL 1x dilution buffer
3. Incubar 30' a 65°C (en el PE 9600)
10. Incubar 10 min a T^a ambient
11. Llegir la llum emesa al luminòmetre –alternativament exposar en film de raig-X (30-1 min).
12. Paràmetres del programa: gain LOW; s'integra la senyal 15,0 s)

7. EXPRESSIÓ I ANÀLISI FUNCIONAL DE PROTEÏNES

7.1. TRADUCCIÓ *IN VITRO* DE cDNA'S MITJANÇANT LISATS DE RETICULÒCIT

Podem dividir el procés de síntesi *in vitro* de proteïnes en tres etapes essencials. Primer s'ha de subclonar el cDNA de la proteïna d'interès en un vector adequat que disposi de llocs pels promotors virals de T7 o T3 per tal de dirigir la transcripció. A partir d'aquest motlle, es sintetitzarà els cRNAs utilitzant les RNA polimerases dels fags abans citats, que alhora seran traduïts a polipèptids en l'etapa següent. finalment, en presència de un lisat de reticulòcit de conill, i afegint al còctel metionina marcada amb Sofre-35, aquests cRNAs podran ser traduïts a proteïna, doncs el lisat aporta tota la maquinaria necessària per realitzar la reacció de traducció. En cas de necessitat de modificacions post-traduccionals, s'ha utilitzat el complement de membranes microsomals pancreàtiques canines, que permetran modificacions postraduccionals.

Reactius

- kit TnT [PROMEGA]
- Redivue L-[³⁵S]Metionina (300 mCi/mmol) [AMERSHAM]
- RNAsina [PROMEGA]
- Microsomes [PROMEGA]
- Material per minigels d'acrilamida

Procediment

1. Compondre la següent reacció de traducció *in vitro*:

Quantitat	Component	V _{final} 20 µL
fins a 25 µL	H ₂ O sense nucleases	
12,5 µL	lisat de reticulòcit*	
1 µL	TnT® reaction buffer*	
0,5 µL	RNasina a 40U/µL	
0,5 µL	barreja d'aminoàcids 1mM (-Met)*	
0,5 µL	RNA polimerase buffer†	
1 µg	motlle de DNA palsmidic	
2 µL	[³⁵ S]-Metionina	
1 µg	motlle de DNA linearitzat	
0,5 µL	RNA polimerase‡	

*Subministrats amb el kit; †T7 o T3, segons el cas

2. Incubar 90 min a 30°C
3. Analitzar els resultats de la traducció en un gel d'acrilamida/SDS-PAGE:

- i) Carregar 5 µL de cada mostra (diluïda 1/5 en tampó de càrrega)

- ii) Córrer el gel, fixar-lo 30 min en tampó de fixació:

Metanol al 50% (v/v)
Àcid acètic al 10% (v/v)

- iii) Incubar 10 min en sal·licilat sòdic 1M (solució fluorogràfica)

- iv) Sucar el gel 5 min en la següent solució:

Metanol al 7% (v/v)
Àcid acètic al 7% (v/v)
Glicerol al 1% (v/v)

- v) Assecar el gel sobre paper Whatman 3MM 1-2h a 80°C sota buit

4. Exposar el gel assecat en un film de raigs X, KODAK a -70°C. revelar al cap de 6-24 h

7.2. EXPRESSIÓ FUNCIONAL EN OÒCITS DE *XENOPUS LAEVIS*

Síntesi *in vitro* de cRNA

El cRNA que s'injecta en els oòcits, es genera mitjançant una reacció de transcripció *in vitro* (dirigida pels promotors de l'RNA polimerasa dels fags T7 i/o T3), utilitzant com a motlle el cDNA linearitzat dels gens que es vulguin expressar. S'ha realitzat amb el kit comercial *mMessage mMachine kit*, d'AMBION, que conté un joc d'enzims amb els quals es pot generar *in vitro* grans quantitats de cRNA amb presència de CAP (l'anàleg de la 7-metil-guanosina (mG(5')ppp(5')G)) en el seu extrem 5', característica important per augmentar-ne la seva estabilitat i eficàcia traduccional dins de l'oòcit.

Reactius:

- Enzims de restricció
- TE 1x
- *mMessage mMachine kit* [AMBION]
- Etanol absolut i al 70 % (v/v)
- Acetat sòdic 3 M, pH 5,2
- Columnetes de gel-filtració

Procediments:

PREPARACIÓ DEL MOTLLE DE cDNA

El plasmidi on estigui clonat el cDNA haurà de incloure els llocs T7 o T3 per iniciar la transcripció, davant de l'ORF del gen. Cal fer notar que per millorar l'eficiència d'expressió, el motlle de cDNA te que tenir una seqüència al final de poli(A), que al ser transcrita dotarà al cRNA de poli(A), el que el farà més estable. Essencialment, el procediment dut a terme aquí es idèntic al descrit en la secció "linearització del motlle plasmídic" del sub-apartat *preparació de sondes* del protocol d'hibridació *in situ* (veure pàgina 130). A continuació es descriurà doncs resumidament el procés en qüestió:

1. Linearitzar el plasmidi que contingui el cDNA codificant del gen a expressar en els oòcits amb l'enzim de restricció adequat. Digerir uns 10 µg de plasmidi. Comprovar en un gel d'agarosa que la digestió hagi estat completa
2. Precipitar el DNA amb etanol, rentar i resuspendre finalment el *pellet* amb 15 µL de TE 1x (*RNase free*)
3. Determinar la concentració a l'espectrofotòmetre (s'han d'obtenir unes concentracions de 0,5-0,9 µg/mL amb unes *ratios* A_{260}/A_{230} de ~1,8.

Reacció de transcripció *in vitro*

1. Constituir la següent reacció de transcripció (a temperatura ambient i en condicions lliures de ribonucleases):

Quantitat	Component	V _{final} 20 µL
fins a 20 µL	H ₂ O sense nucleases	
2 µL	10x reaction buffer*	
10 µL	2x Ribonucleotide mix*	
1 µg	motlle de DNA linearitzat	
2 µL	10x enzyme mix*	

2. Incubar 2 h a 37°C
3. Supressió del motlle de DNA: Afegir al tub 1 µL

de *DNaseI* *Subministrats amb el kit

4. Incubar 15 min més a 37°C
5. Recuperació del cRNA:
 - i) Afegir 20 µL de H₂O sense *RNases*
 - ii) Afegir 1 volum (*i.e.* 100 µL) de fenol, vortexar extensivament i centrifugar 5 min a 14.000 rpm
 - iii) Descartar la fase orgànica, repetir la fenolització un cop més
 - iv) Traspasar la fase aquosa a una columneta comercial de gel-filtració *quick spin column*, [Parmacia], centrifugar 1 min a 3500 rpm
 - v) Afegir a l'eluït de la columneta, 1/10 part en volum d'Acetat sòdic 3M a pH 5,2
 - vi) Afegir-hi 3 volums d'etanol absolut a -20°C, mantenir precipitant a -20°C durant 2 h com a mínim
 - vii) Centrifugar 15 min a 14.000 rpm (4°C)
 - viii) Rentar el *pellet* dos cops amb etanol absolut fred
 - ix) Amb molta cura descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* final de cRNA amb 20 µL d'H₂O lliure de ribonucleases

6. Quantificació del cRNA sintetitzat: determinar l'absorbància a 260 nm i la ratio 260/230 (s'espera obtenir concentracions de 0,5-2 µg/mL i ratios >1.8)
7. Gel diagnòstic: Preparar un minigel d'agarosa i
- correr 0,75 mL del cRNA sintetitzat per tal de comprovar-ne l'integritat
8. Aliquotar el cRNA, diluït $1/10$ i sense diluir, guardant-lo a -80°C

Obtenció i preparació d'òocits per microinjectar

Els òocits s'extreuen de granotes femella adultes, mitjançant una senzilla operació quirúrgica en que se'ls hi practica una incisió abdominal, per on s'extreuen parcialment els òocits de dins del lòbul ovàric. Les femelles operades es poden reciclar i reutilitzar com a donadores d'òocits en el futur (com a mínim però, cal esperar un mes abans de la següent intervenció). el procediment quirúrgic és el següent:

Reactius

- Material quirúrgic esterilitzat
- Anestèsic: MS222 (Sandoz)
- Col·lagenasa [BOEHRINGER MANHEIM]
- Solució ORII (NaCl 82,5 mM, MgCl₂ 1 mM, KCl 2 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4)
- Tampó salí *Barth* Modificat (ref. [272])

Procediment

1. Anestesià una granota *Xenopus* femella per immersió en una solució preparada amb H₂O de l'aixeta on s'ha dissolt l'anestèsic al 0,1 % (w/v). Mantenir l'animal 20 min en aquesta solució
2. Quan l'anestèsic ha fet el seu efecte, rentar breument la granota sota l'aixeta i col·locar-la panxa enlaire sobre gel cobert amb draps mullats (amb els que alhora s'embolcallarà cap i potes de l'animal), per tal de mantenir-lo hidratat i adormit durant l'intervenció.
3. Practicar una petita incisió (~1 cm) al cantó ventral posterior, tallant la pell i la capa muscular inferior, per on amb l'ajut d'unes pinces s'exposarà a l'exterior de l'abdomen el lòbul ovàric, replet d'òocits.
4. Tallar amb unes tisores petits grups d'òocits del lòbul, dipositant-los sobre una placa de petri plena de solució ORII
5. retornar el lòbul restant a dins la panxa de la granota i suturar la incisió (pell interna i múscul separatament de la pell externa)
6. Reanimar i deixar recuperar la granota operada durant unes hores dins d'aigua de l'aixeta, tot procurant de que li quedi el cap fora de l'aigua per no ofegar-se.
- els lòbuls ovàrics dins la placa de petri per tal d'alliberar-ne el màxim nombre de grumolls d'òocits
8. Tractar els òocits extrets amb una solució de col·lagenasa al 3% (w/v) (preparada en tampó ORII). Usualment es realitza dins un tub de 15 mL on s'hi barregen uns 3 mL d'òocits i 10 mL de la solució de col·lagenasa
9. Incubar amb agitació orbital a temperatura ambient (inferior però de 25°C) durant 45min, amb un recanvi de solució fresca entremig.
10. Després del tractament per eliminar les capes fol·liculars, rentar acuradament i extensiva els òocits amb tampó ORII (realitzant de 4-5 canvis de solució)
11. Rentar varis cops mes ara amb tampó Barth
12. Disposar els òocits defol·liculats en plaques de petri amb tampó Barth, per realitzar-ne la tria
13. Seleccionar, sota lupa, aquells òocits aptes per la microinjecció, *i.e.* els d'aparença saludable i morfològicament intactes (correspon als estadis V-VI: 1-1,2 mm de diàmetre amb el pol animal pigmentat marró o negre, i el pol vegetal de color groguenc). descartar-ne la resta

Conservar els òocits de bona qualitat seleccionat en tampó Barth incubant-los a les fosques a 18°C

Tractament dels òocits

7. Amb l'ajut de dos pinces de rellotger, estripar

Microinjecció de cRNA en oòcits de *X. laevis*

Els oòcits sense folicle preparats prèviament, es microinjecten per el seu pol vegetal amb un capil·lar de vidre estirat adaptat a una micropipeta. Normalment s'han microinjectat volums de 50 nL (equivalent a una quantitat total de 5 ng de cRNA), o d'aigua destil·lada estèril. Un cop injectats, els oòcits es mantenen en medi Barth (amb gentamicina 1 mL/L) a la foscor en un incubador a 18°C. El medi es canvia cada dia durant tres dies, descartant els oòcits morts o d'aparença insana. Al tercer dia es procedirà a realitzar els assaigs de transport, un cop els oòcits expressen les activitats de transport codificades pel cRNA injectat.

Assaigs de transport

Els assatjos de captació (*uptake*) es van realitzar incubant els oòcits injectats prèviament amb un medi iònic de transport tamponat, basat en el catió colina enlloc de sodi (ja que el transport a mesurar és independent de sodi), al que s'havia incorporat el traçador radioactiu a la concentració adient, la captació del qual es volgués assajar. La majoria de substrats utilitzats estaven marcats amb ^3H o amb ^{14}C (excepte alguns casos en que contenien àtoms de ^{125}I). Al acabar el període d'incubació, el transport s'atura mitjançant el rentat del oòcits ràpida i abundantament en el tampó d'*uptake* a 0°C, per tal de minimitzar la unió inespecífica del radiosubstrat a la seva superfície. Els oòcits es transfereixen individualment a vialets de centelleig, on seran lisats amb detergent. La radioactivitat incorporada es mesura llavors per comptatge de centelleig líquid en un comptador β .

Abans de començar amb el procediment pròpiament dit, es seleccionaran els oòcits injectats d'aparença sana, descartant-se els de coloració fosca, forma irregular o indicis de degeneració. Cada valor final de transport prové de la mitja de les dades individuals obtingudes a partir de 8-12 oòcits per situació.

Reactius:

- *Uptake buffer (choline-based)*: clorur de colina 10mM, KCl 2mM, MgCl 1mM, HEPES 10 mM, pH 7,5
- Substrats marcats radioactivament i "freds"
- Tampó de lisi: SDS al 10% (w/v)
- Vialets i solució de centelleig

Procediment:

- | | |
|--|---|
| 1. Pre-rentar els oòcits per l'assaig varies vegades en <i>uptake buffer</i> | mateix tampó fred |
| 2. Incubar els grups d'oòcits en 100 μL de <i>uptake buffer</i> suplementat amb el substrat adequat (marcat radioactivament) a la concentració indicada | 6. Transferir individualment cada oòcit a un vialet de centelleig buit |
| 3. Incubar els oòcits a 25°C el temps necessari, en un bany d'aigua | 7. Afegir 250 μL de tampó de lisi a cada vialet |
| 4. Aturar el transport (posteriorment a la retirada del medi de transport del tub) per addició de 3 mL de medi de transport fred (refredat en gel) a un tub amb 3 mL | 8. Afegir-hi 4 mL de líquid de centelleig; tancar els vials |
| 5. Realitzar tres rentats consecutius amb 6 mL del | 9. Vortexar vigorosament cada vialet per barrejar el seu contingut |
| | 10. Posar els tubs al comptador β i procedir al comptatge:
(programa per comptar triti, 5 min totals de comptatge) |

Aplicant els factors de conversió adients, els valors del comptatge obtinguts en *cpm*'s es transformen finalment en valors de transport, expressats en fmol de substrat/min i oòcit.

1.3. ANNEX: COMPOSICIÓ DE MEDIS I SOLUCIONS

Tampons generals			
Nom	Composició		Comentaris
MOPS 20x	MOPS	0,4 M	Ajustar el pH a 7,0; Esterilitzar per filtració
	Acetat Sòdic	0,1 M	
	EDTA	0,01 M	
PBS 1x	NaCl	137 mM	Esterilitzar mitjançant autoclavat
	KCl	2,5 mM	
	Na ₂ PO ₄	10 mM	
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM	
Solució D	Tiocianat de Guanidina	4 M	Preparar en H ₂ O-DEPC Guardar a 4°C; abans d'utilitzar afegir β-Mercaptoetanol fresc (7,2 μL/ mL de solució D)
	Citrat Sòdic, pH 7,0	25 mM	
	N-Lauroil Sarcosina (Sarcosil)	0,5 % (v/v)	
SSC 20x	NaCl	3 M	Ajustar el pH a 7,0 amb HCl; autoclavar
	Citrat Sòdic	0,3 M	
TE 1x	Tris-Cl, pH 8,0	10 mM	Autoclavar
	EDTA	1 mM	
Tampó SM	Tris-Cl, pH 7,5	50 mM	Esterilitzar per autoclavat; guardar en alíquotes de 10 mL
	NaCl	100 mM	
	MgSO ₄	8 mM	
	Gelatina	0,01 % (w/v)	
TAE 1x	Tris base	40 mM	Ajustar el pH a 8,1; autoclavar
	Àcid Acètic	2 mM	
	EDTA	0,2 mM	
Medis de Cultiu Bacterians			
Nom	Composició		Comentaris
Medi LB (per 1 litre)	Triptona (DIFCO)	10 g	Ajustar el pH fins a 7,5 amb NaOH i autoclavar
	Yeast extract (DIFCO)	10 g	
	NaCl	5 g	
Medi NZY	NZY (GIBCO)	15 g/L	Dissoldre el NZY en pols en aigua destil·lada i autoclavar
LB-agar (per 1 litre)	Triptona (DIFCO)	10 g	Dissoldre tots els components, autoclavar i deixar solidificar
	Yeast extract (DIFCO)	10 g	
	NaCl	5 g	
	Agar	15 g	
Top agar (per 100 mL)	Triptona (DIFCO)	1 g	Ajustar el pH fins a 7,5 amb NaOH i autoclavar; deixar solidificar
	Yeast extract (DIFCO)	1 g	
	NaCl	0,5 g	
	Agarosa (ECOGEN)	0,7 g	