

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1. Estudio y clasificación de afectados de retinopatías hereditarias. Recogida de los datos y evaluaciones de los pacientes afectados de retinosis pigmentaria obtenidos en las visitas oftalmológicas y en los estudios electrofisiológicos. Se han empleado protocolos establecidos internacionalmente tanto para la clasificación genética como para el estudio clínico.
2. Clasificación genética de los pacientes afectados de RP, atendiendo a su patrón de herencia. Visita y/o recogida de los datos familiares con el fin de trazar los árboles genealógicos de las familias.
3. Determinación del origen molecular de la retinosis pigmentaria en los casos de retinosis pigmentaria autosómica dominante (RPAD). Análisis directo y caracterización de mutaciones de los genes de expresión específica en retina asociados a RPAD.
4. Análisis de mutaciones en genes asociados a RPAD en casos asilados o esporádicos de RP (SRP).
5. Clonación de los genes NRL y CRX, factores de transcripción de genes específicos de retina y asociados a RPAD.
6. Estudio de expresión in vitro de dos mutantes del factor de transcripción NRL, detectados en el grupo de pacientes. Estudio de los mecanismos moleculares patológicos que inducen estos mutantes.
7. Estudio de la expresión clínica de las mutaciones detectadas y su correlación fenotipo-genotipo.

III. MATERIAL Y METODOS

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. EQUIPAMIENTO GENERAL

III.1.1. Instrumental

Agitador magnético. Micromix. Ovan.

Agitador orbital. Roto-Shake Genie. Scientific Industries-1101.

Agitador rotativo. Atom 85.

Autoclave. Spriand Española, S.A.

Balanza. Mettler P1210.

Baño Termostático. Ultraterm. J.P.Selecta.

Bloque térmico. Tem-Bloc. P. Selecta.

Bomba de vacío. MP24. Heidolph.

Cabina de flujo laminar. UN-425-400E. Nuaire.

Cámara fotográfica UV. Polaroid / GelCam.

Centrífugas de mesa. Heraeus / Megafuge 1.0 / Hermle Z300.

Congeladores (-20°C / -80°C). Edesa, style / Nuaire.

Cubetas de electroforesis para geles de agarosa. Ecogen.

Cubetas para electroforesis vertical. Hoefer SE 600Ruby/CBS; Scientific Co.ASU-250

Estufa. B6760. Heraeus.

Espectrofotómetro UV/Visible. V-530 Jasco.

Filtros poro 0,22µm. Millex™. Millipore.

Fuentes de alimentación. Genenco EPS Pegaso 100/Atom 500

Incubador de CO₂. Nuaire. US Autoflow/CO₂ Water Jacketed Incubator.

Kit Polaroid de filtro de electroforesis.

Lámpara de ultravioleta. Vilber Lourmat TFL 20M.

Luminómetro. Sirius. Berthold.

Microcentrífuga. Sigma 202M.

Microondas. Micrologic.

Micropipetas Nichiryo / Gilson.

Microscopio invertido. Motic AE300.

Película Polaroid tipo 667.
 Pipetas, 5 y 10ml. DELTALAB, Eurotubo.
 Placas de cultivo células eucariotas, p6 y p100. FALCON®. Becton Dickinson.
 Placas de petri. Soria Genlab, S.A.
 Probetas. Azlón.
 Puntas estériles con filtro. Sorenson / Bioscience, Inc.
 Termociclador. FPROG05D / Progene.
 Termociclador de gradiente. PTC-200 / M.J.Research.
 Tubos polipropileno. 0,2ml, 0.5ml / Sorenson / MJ.Research; 1,5ml, 2ml / Eppendorff.
 Secuenciador. Long-Read Tower™ System / Visible Genetics, Inc.
 Vasos de precipitados. Azlón.
 Vortex Genie 2 / Scientific Industries, Inc.

III.1.2. Material utilizado

Ácido acético glacial	Merck
Acrilamida/Bisacrilamida (37.5:1)	Bio-Rad
Agarosa	Ecogen / Bio-Rad
AgNO ₃	Merck
Agua bidestilada	B. Braun
Alcohol Isoamílico	Amresco
Ampicilina	Invitrogen
Azul Trypan	Gibco
BSA (Albúmina sérica bovina)	Roche
Bromuro de etidio	Amresco
CaCl ₂	B. Braun
CO ₃ Na ₂	Amresco
Cloroformo/Alcohol Isoamílico	Amresco
DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium)	Gibco
DMSO (Dimetilsulfóxido)	Amresco
dNTP's	Roche
EDTA	Roche
Enzimas de restricción	Fermentas / NEB.

Etanol	Merck
Expand Long Template	Roche
Fenol	Amresco
Formamida	Roche
Fosfatasa Alcalina (SAP)	Roche
Glicerol	Roche
Glycina	Merck
Hepes	Gibco
HNO ₃	Merck
KCl	Amresco
Kit de extracción: "QIAquick Gel Extraction Kit"	Qiagen
"QIAamp DNA Blood Mini Kit"	Qiagen
Kit de secuenciación: "Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit"	Amersham
Kit de clonación: "TOPO [®] XL PCR Cloning Kit"	Invitrogen
Kit de ligación: "Rapid DNA ligation Kit"	Roche
Kit de extracción: "QIAprep Miniprep Kit"	Qiagen
Kit de extracción: "Hi Speed plasmid Purification Kit"	Qiagen
LBAgar (Lennox L Agar)	Invitrogen
LyoVec [™]	Invivogen
Marcadores de peso molecular	Roche / Biotools
MgCl ₂	Amresco
NaCl	Amresco
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	Amresco
NaOH	Amresco
Nonidet P40 (BDH)	Amresco
Oligonucleótidos sintéticos	Tib Molbiol
PBS	Amresco
Persulfato amónico	Amresco
Pfu-turbo	Roche
Proteinasa K	Qiagen
SBF (Suero Bovino Fetal)	Gibco
SDS	Roche
Tampón de carga (6x Agarose gel. Loading dye)	Amresco
Tampón TAE	Amresco

Tampón TBE	Amresco
Tampón TE	Ecogen
TB (Terrific Broth)	Gibco BRL®
T4-Ligasa	Roche
TEMED	Sigma
Tripsina	Gibco
Urea	Roche

III.2. PACIENTES Y FAMILIAS ESTUDIADOS

Se han incluido todos los individuos explorados en la consulta de Oftalmología y encuestados por el servicio de Genética, clasificados:

- Clínicamente, según el estatus del paciente, como sano o afectado. Se incluyeron como afectados los individuos que cumplían los criterios diagnósticos de RP (aptdo.I.2.1); se incluyeron como sanos los parientes en primer, segundo o tercer grado que no cumplían los criterios de RP. En el estudio genético se incluye un individuo afectado como caso índice de cada familia. En caso de detectarse una mutación, el estudio se extiende a los demás componentes de la familia, que hayan aceptado colaborar en el estudio.
- Genéticamente, según el patrón de herencia que presenta la enfermedad en la familia, se incluyeron los casos de RPAD y SRP. Los datos de filiación, una serie de preguntas sobre síntomas y signos de la enfermedad, así como datos referentes a familiares, se recogieron en un cuestionario que rellenaron los pacientes afectados o familiares que acudieron a los servicios de Oftalmología o Genética. La clasificación de las familias en subtipos genéticos se realizó de acuerdo con los criterios previamente establecidos por Ayuso y cols., 1995.

Los individuos en estudio acudieron directamente al Hospital de Terrassa, o a otros centros hospitalarios como el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona), la Fundación Jimenez Díaz (Madrid), Hospital Virgen del Rocío (Sevilla), y Hospital Universitario La Fe (Valencia). Todos ellos pertenecientes al grupo multicéntrico español de investigación sobre RP.

Los servicios de genética y oftalmología de estos centros externos remitieron las muestras de ADN junto con los informes clínicos de las familias clasificadas como RPAD para incluirlas en nuestro estudio.

A cada familia y a sus integrantes explorados se les asignó un número de identificación único en el registro de RP español.

En total se han estudiado 150 casos índices pertenecientes a familias autosómicas dominantes y 100 pacientes catalogados como casos aislados o esporádicos (SRP). El estudio familiar, tras resolver la mutación, se extendió sobre 24 familias.

Tras su análisis, las muestras de ADN de estos pacientes se almacenaron a -20° C para el posible análisis futuro de nuevos genes candidatos que se relacionen con la enfermedad.

Los pacientes y familiares que participaron en este estudio fueron informados de los objetivos del mismo y se les pidió su consentimiento. El trabajo realizado cumple escrupulosamente con las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y sus posteriores ampliaciones.

III.3. ESTUDIO CLINICO

El protocolo seguido por los distintos servicios de oftalmología a los que acudieron los pacientes estudiados fue el siguiente:

a) Examen Oftalmológico:

Anamnesis:

Antecedentes oftalmológicos en relación con la RP:

Edad de diagnóstico.

Edad de comienzo de la ceguera nocturna.

Edad de comienzo de síntomas de disminución del campo visual.

Edad de comienzo de disminución de la agudeza visual.

Otros síntomas (fotofobia, alteración de los colores, fopsias...)

Otros antecedentes oftalmológicos (cataratas, etc...)

Antecedentes sistémicos: Antecedentes generales y específicamente hipoacusias, endocrinopatías, obesidad, malformaciones congénitas y otras enfermedades asociadas a las formas sindrómicas de RP.

Exploración:

Agudeza visual: la medida de AV se ha realizado utilizando un proyector de optotipos de luminosidad variable de la casa General Optica modelo EP. 615-R calibrado para tomar la visión a una distancia equivalente a 5 m.

Refracción: Aquellos pacientes cuyas agudezas visuales estaban por debajo de 0,05 fueron explorados mediante refractómetro

automático Luneau L 60 Keratoref, con el fin de conocer en todos los casos el defecto de refracción de los pacientes.

Biomicroscopía del segmento anterior: Sólo se han incluido en el estudio los hallazgos del cristalino (aunque hayan sido explorados párpados, conjuntiva, córnea, cámara anterior, iris y cristalino). Se han descrito la localización de las opacidades o tipo de catarata. Modelo de lámpara utilizado ha sido Takagi SM-12H.

Motilidad Ocular Extrínseca: A todos los pacientes se les exploró realizándoles cover test, estudio de las ducciones, versiones y vergencias.

Pupilas: Se ha estudiado la forma, tamaño, simetría, reflejo fotomotor directo y consensual de las pupilas de todos los pacientes.

Presión intraocular: A los pacientes de edades superiores a los 15 años, se les ha medido la presión intraocular mediante la tonometría de aplanación con un tonómetro Perkins, previa instilación de gotas Fluortest® (oxibupracaina + fluoresceína)

Campo visual: Se ha explorado el campo visual con el programa nº24 del campímetro Octopus 500 que realiza una campimetría estática, primero de los 30° centrales, con la corrección que precise el paciente para cerca, y luego hasta los 60° nasales y 90° temporales. Utiliza estímulo supraumbral y una densidad homogénea de puntos en todo el campo. Los resultados se exponen en valores absolutos, valores comparados con el patrón normal en cada edad y escala de grises.

Fondo de Ojo: Se ha realizado con el oftalmoscopio indirecto modelo Clement Clarke Ultra 50 y lentes de 20 y/o 28 en todos los casos. Siempre tras dilatación con colirio de tropicamida y a veces también fenilefrina o con ciclopéjico en los casos en los que debían realizar una refracción en esas condiciones.

La descripción de los depósitos de pigmento en los casos en los que existía ha sido la siguiente:

Forma del pigmento: Osteoclastos o espículas.

Redondeado.

Localización: Difuso / regional.

Media periferia / periferia.

Polo posterior / cuadrantes.

Paravascular

Cantidad: Escaso/ medio / abundante.

- “Difuso” se refiere a una disposición generalizada del pigmento en 360°, si bien no necesariamente ocupa la totalidad de la retina (polo posterior, media periferia y periferia), sino que en cualquiera de éstas localizaciones o en más de una se encuentra en todos los cuadrantes.
- “Regional” hace referencia a una localización restringida a dos cuadrantes como máximo, en cualquiera de las localizaciones.
- “Sectorial” cuando se encuentra sólo en un cuadrante sobre todo en el inferonasal y se mantiene así sin extenderse.
- “Paravascular” cuando ésta es la única o la extremadamente predominante.

El resto de las localizaciones llevan implícita la disposición paravascular del pigmento en algún punto, excepto en las formas de “preservación de pigmento paraarteriolar”, en cuyo caso, se describe expresamente este respecto de la zona paravascular por el pigmento.

Test de Colores: Se han utilizado los tests 28 HUE de Roth y 15 HUE Désaturé de Lanthon, ambos según Farnsworth-Munsell. Sólo se realizaron a aquellos pacientes que referían alteración en la percepción de colores.

Angiofluoresceingrafía y slo: Fue realizada cuando se consideró necesario para el diagnóstico de maculopatía.

b) Examen electrofisiológico:

ERG: El estudio protocolarizado incluye un electroretinograma de campo completo y estímulo difuso con flash en cúpula de ganzfeld siguiendo las normas internacionales del “Internacional Standardization Committee for Electrophysiology of the Vision” (ISCEV).

Tipos de respuestas registradas: Respuesta de bastones; Respuesta máxima o mixta de bastones y conos; Potenciales oscilatorios; Respuesta de conos o flashes aislados; Respuesta de filcker de 30 Hz.

Otros: En algunos casos se realizó Electrooculograma y Potenciales Evocados Visuales (en algunos casos de ERG no registrable, como medida de la función visual residual).

III.4. ESTUDIO GENETICO DIRECTO DE GENES IMPLICADOS EN ADRP

El protocolo seguido en el laboratorio para el estudio genético directo se realizó de la siguiente manera:

- a) Extracción de ADN a partir de sangre periférica.
- b) Amplificación, por reacción en cadena de la polimerasa, de las secuencias codificantes (exones) y pequeñas secuencias intrónicas correspondientes a los extremos 5' y 3' colindantes de cada exón del gen en estudio.
- c) Cribado de mutaciones y polimorfismos mediante la técnica de DGGE “denaturing gradient gel electrophoresis” (Fischer y Lerman, 1979), en la mayoría de los casos y la de SSCP “single strand conformation polymorphism” (Orita y cols, 1989), en los casos en los que la DGGE no fue resolutive.
- d) Secuenciación automática en los casos en los que se detectó un patrón anormal de electroforesis mediante las técnicas citadas anteriormente.
- e) Análisis de restricción, mediante las enzimas de restricción apropiadas, si el cambio observado mediante secuenciación modifica (genera o destruye) una diana de restricción. Se utiliza como comprobación de la mutación observada mediante secuenciación.
- f) Análisis molecular familiar: determinación de la co-segregación de la enfermedad con la mutación por el método más adecuado de los que se mencionan.

Los genes en los que se realizó el estudio genético directo fueron los siguientes:

LOCUS	GEN	PROTEÍNA	Nº ACCESO (GENBANK)
3q21-qter	RHO	Rodopsina	NT- 005621
6p21.1-cen	RDS	Periferina	NT- 007592
11q13	ROM1	ROM-1	NT- 033903
14q11	NRL	NRL	NT- 026437
19q13.3	CRX	CRX	NT- 011109
8q12.1	RP1	RP-1	NT- 008183

III.4.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de sangre periférica según los siguientes protocolos (se ha utilizado uno u otro indistintamente):

III.4.1.1. Extracción “fenol-cloroformo” (John y cols., 1991)

1. Recoger 5 ml de sangre en un tubo vacutainer que contenga EDTA (anticoagulante).
2. Añadir solución I (10 mM Tris pH 7.6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂) hasta 10 ml, para lisar las células.
3. Añadir 120 µl de Nonidet P40 (BDH). Agitar bien invirtiendo el tubo varias veces.
4. Centrifugar a 2000 r.p.m. / 10 min. para precipitar el complejo ADN-proteína.
5. Decantar el sobrenadante. En este paso el sedimento obtenido puede guardarse congelado.
6. Redisolver el sedimento en 800 µl de solución II (10 mM Tris pH 7.6; 10mM MgCl₂; 0.5% SDS; 2 mM EDTA) para desagregar el complejo

ADN-proteína. Transferir el contenido a un tubo de 1.5 ml para microcentrífuga.

7. Añadir 400 μ l de fenol (saturado con 1M Tris pH 8.0) y agitar.
8. Centrifugar a 12000 r.p.m. / 1 min. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio (en este paso no es grave arrastrar algo de sobrenadante).
9. Añadir 200 μ l de fenol + 200 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Agitar bien.
10. Centrifugar a 12000 r.p.m. / 1 min. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio.
11. Añadir 400 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico y extraer según se ha descrito.
12. Transferir la fase acuosa a un recipiente limpio. Evitar arrastrar restos de la interfase. Añadir tres volúmenes de etanol absoluto y agitar para precipitar el ADN.
13. Centrifugar a 12000 r.p.m. / 20 min. y decantar el etanol. Añadir 1ml de etanol 80%. Agitar bien para eliminar restos de sales.
14. Centrifugar a 13000 r.p.m. / 5 min. Decantar el etanol.
15. Secar a 50°C / 5 min. los restos de etanol.
16. Resuspender en 200 μ l de agua destilada o TE.

III.4.1.2. Extracción por columnas utilizando el kit “QIAamp® DNA Blood Mini Kit” (QIAGEN)

1. Añadir 20 μ l de Proteasa QIAGEN (Proteinasa K) en el fondo de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Añadir 200 μ l de sangre periférica al tubo.
3. Añadir 200 μ l de Tampón AL. Mezclar con la ayuda del vortex durante 15 s.
4. Incubar a 56°C / 10 min.
5. Realizar un golpe de centrifuga (3000 r.p.m. / 3 s.) para recoger cualquier resto de muestra de las paredes o el tapón del tubo.
6. Añadir 200 μ l de EtOH (96-100%) y mezclar con la ayuda del vortex / 15 s. Volver a realizar un golpe de centrifuga.

7. Transferir el contenido del tubo de microcentrifuga a la columna "QIAmp" (contenida en un tubo colector de 2 ml) cerrar el tapón y centrifugar a 8000 r.p.m. / 1 min. Desechar el tubo colector con el eluido y reemplazarlo por uno nuevo.
8. Añadir 500 µl de Tampón AW1. Cerrar el tapón y centrifugar a 8000 r.p.m. / 1 min. Desechar el tubo colector con el eluido y reemplazarlo por uno nuevo.
9. Añadir 500 µl de Tampón AW2. Cerrar el tapón y centrifugar a 13000 r.p.m. / 3 min.
10. Desechar el tubo colector con el eluido y reemplazarlo por uno nuevo. Centrifugar a máxima velocidad / 1min. De esta forma se elimina cualquier resto de EtOH que podría interferirnos en reacciones posteriores.
11. Colocar la columna "QIAmp" en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y desechar el tubo colector con el eluido.
12. Añadir 200 µl de tampón AE o agua destilada.
13. Incubar a temperatura ambiente / 1 min.
14. Centrifugar a 8000 r.p.m. / 1 min.

III.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de las secuencias genómicas de los genes a estudio (N^{os} de acceso / Gen Bank - tabla inicio aptdo.III.4.-) y con la ayuda del programa informático "Oligo", se definieron y diseñaron los cebadores más adecuados para amplificar, mediante PCR, las regiones codificantes y secuencias flanqueantes a analizar en cada gen.

Uno de cada par de los cebadores utilizados para realizar este trabajo, con excepción de los empleados para el estudio del exón 2A del gen NRL, ha sido sintetizado con una cola GC de unos 40 pb en 5' (Abrazadera GC o "GC-clamp") (Myers y cols., 1985). Durante la reacción de PCR, el dominio rico en GC se incorpora a uno de los extremos del producto resultante. Esta abrazadera permite la detección por DGGE (aptdo.III.4.3.1.) de mutaciones o cambios de

base localizados en dominios de la molécula de ADN que presentan un punto de fusión muy alto e impiden la disociación completa de la molécula perdiéndose así la migración dependiente de secuencia, fundamento de la técnica DGGE (Sheffield V.y cols. 1989).

Las condiciones de reacción (temperaturas de desnaturalización, anillamiento y extensión / nº de ciclos) así como las secuencias de los cebadores utilizados para cada uno de los fragmentos de los distintos genes analizados se recogen en la tabla II.

Para la reacción de PCR se han utilizado tubos de 0,2-0,5 ml (según el termociclador utilizado) de paredes finas, también denominados tubos “thin wall”, que facilitan la transmisión de calor a la disolución, disminuyendo así la diferencia entre la temperatura real de la disolución con la programada en el termociclador.

Los reactivos utilizados y sus concentraciones fueron las siguientes:

Reactivos (stock)	Volumen (μl)	Concentración (final)
Tampón (10x)	5	1x
MgCl₂ (50mM)	1,5	1,5 mM
Cebadores (25 pmol/μl)	1	0,5 μ M
Nucleótidos/mix dNTP's (10mM)	1	0,2 mM
DMSO (Dimetilsulfóxido)	5	1x
Taq-polimerasa (5u/μl)	0,5	2,5 uds.
H₂O	c.s.p. 50	

La polimerasa empleada en todos los casos, Ecotaq (*Ecogen*), es una polimerasa termoestable, de alta pureza y actividad.

III.4.2.1. Análisis del resultado de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa

La migración de los ácidos nucleicos a través del gel de agarosa varía, entre otros factores, en función de su peso molecular, conformación, gradiente de voltaje y concentración a la que se encuentre la agarosa en el gel.

% Agarosa en el gel	Eficiencia en separación de moléculas lineales de ADN (kb)
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

Preparación de un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1x:

1. Disolver 0.75 g de agarosa en 50 ml de tampón TAE 1x en un microondas (en general no se corrigió el volumen de H₂O evaporado al calentar)
2. Añadir 1.5 µl de solución de bromuro de etidio (10mg/ml) (agente fluorescente que se intercala entre las bases nitrogenadas y es visible cuando se ilumina con luz UV / 302-365nm).
3. Verter la solución sobre el lecho de la cubeta de electroforesis, en la que se ha colocado un peine para 10 pocillos, y dejar enfriar hasta su completa polimerización.
4. Retirar el peine suavemente y sumergir el gel en la cubeta de electroforesis que contiene tampón TAE 1x.
5. Cargar en el gel:
 - 10-20 µl de producto de PCR que contiene 1-2 µl de tampón de carga 10x.

- 10-20 μ l de un control negativo que contiene 1-2 μ l de tampón de carga 10x. Este control nos alerta de la presencia de contaminación en cualquiera de los reactivos utilizados en la reacción de PCR, en caso de no ser negativo.
- 10 μ l de marcador de peso molecular, que contiene fragmentos de ADN crecientes en 100pb desde 100-1000pb (“DNA ladder”).

Se corren las muestras a 100V hasta que el frente del colorante que contiene el tampón de carga (de migración más rápida que la muestra) alcance el extremo del gel.

Las bandas de ADN se visualizan con luz UV, y se comprueba que la reacción de PCR ha funcionado al obtener bandas específicas del tamaño esperado y de una intensidad suficiente (buen rendimiento). Se comprueba también que el control negativo no presente amplificación (que indicaría contaminación en el proceso).

Se registra el resultado fotografiando el gel con una cámara fotográfica (Polaroid / película Polaroid Type 667) a la que se ha acoplado un filtro naranja especial para fotografiar geles teñidos con bromuro de etidio y visualizados con un transiluminador UV (302 nm).

La exposición adecuada en este caso es de f/16, 1/4 s.

Tampón TAE 1x: 40 mM Tris (pH 7.6), 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA.

Tampón de carga (stock 10x): 50% glicerol; 0.25% azul de bromofenol en tampón TAE 1x.

III.4.2.2. Estimación de la concentración de ADN en geles de agarosa

Se realiza rutinariamente una medida aproximada de la concentración de las muestras de ADN comparando la intensidad de fluorescencia en UV de la muestra respecto a la de un marcador de ADN de peso molecular y concentración conocidos.

III.4.3. Cribado de mutaciones

III.4.3.1. Técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

La técnica de DGGE se basa en la distinta movilidad electroforética de las moléculas de ADN a través de un gel de poliacrilamida con un gradiente lineal desnaturante ascendente y vertical, en función de su comportamiento de fusión o desdoblamiento de la doble cadena.

Una molécula de ADN será desnaturada por regiones llamadas dominios de fusión. Cada dominio desnaturiza a una temperatura determinada (T^a de fusión o T_m) que se define como la temperatura a la que cada par de bases de ADN dúplex está en equilibrio 50 a 50 entre el estado helicoidal y el desnaturizado.

La fusión de la doble cadena de ADN no sólo se logra por el ΔT^a , también es dependiente del medio en que esté disuelta. Los agentes desnaturizantes utilizados para la realización de esta técnica han sido la temperatura y los reactivos formamida y urea. Cada caso ha precisado unas determinadas condiciones desnaturizantes para ser resuelto. Las modificaciones en el porcentaje desnaturante se han realizado variando los porcentajes de los agentes desnaturizantes formamida y urea, mientras que la T^a se ha mantenido prácticamente constante (Tabla II).

La realización de esta técnica exige que los fragmentos de ADN que han de ser analizados contengan en su extremo 5' una abrazadera GC o "GC-clamp", introducida durante la reacción de PCR (aptdo.III.4.2.), previa al análisis electroforético.

El comportamiento de fusión de secuencias de ADN conocidas puede ser simulado por ordenador. La temperatura de fusión se determinó, para cada uno de los exones de los distintos genes (Tabla II), mediante la aplicación de un programa informático WinMelt (*BioRad*) que permite identificar los diferentes dominios de fusión de la molécula de ADN y su T_m específica. Los datos proporcionados por el programa, los asociamos a límites de gradiente

desnaturalizante. En los casos en los que los gradientes determinados no resuelvan bien las muestras, se procede al cálculo empírico del gradiente adecuado mediante la realización de una electroforesis con un gradiente perpendicular desnaturalizante de formamida-urea.

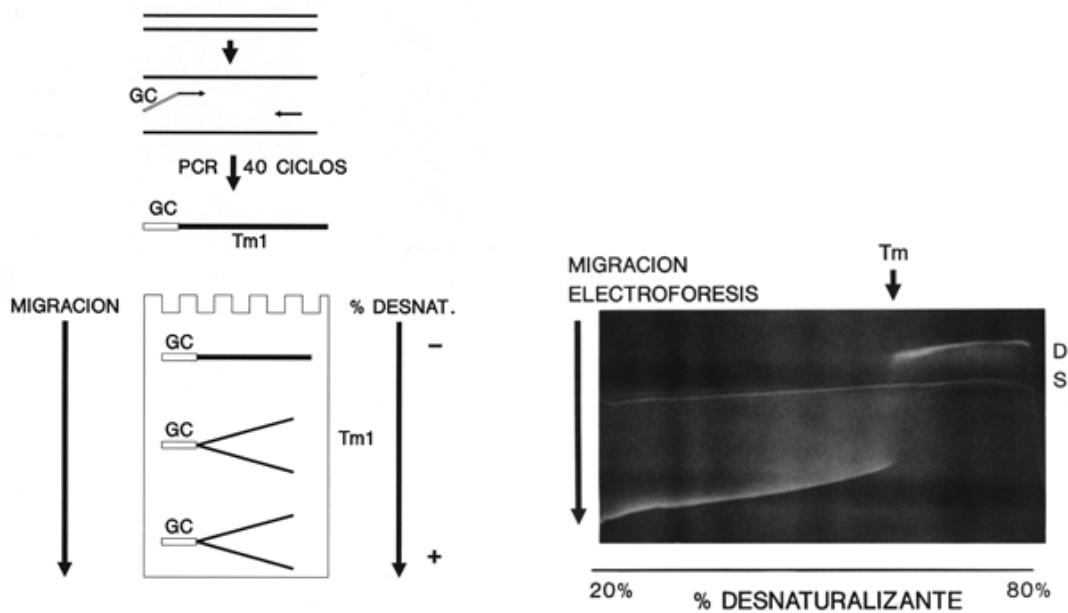


Figura 11. (Izqda.) Incorporación de la abrazadera GC en la PCR y posterior DGGE. (Dcha.) Electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida con un gradiente perpendicular desnaturalizante; D y S: ADN de cadena doble y sencilla. En este caso, la transición en la migración electroforética de la cadena de ADN se produce al 62% de concentración de agentes desnaturalizantes. El gradiente elegido para resolver este fragmento estará entre el 50-75% de desnaturalizante.

El gel de poliacrilamida se realiza a partir de dos soluciones madre:

Reactivos	Solución 0% (ml)	Solución 80% (ml)
acrilamida:bis acrilamida (40%) (37,5:1)	20	20
Tampón T.A.E. 10x	10	10
Formamida	----	32
Urea	----	34 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 100	c.s.p. 100

El gradiente desnaturante del gel en cada caso, se establece mezclando ambas soluciones en proporciones adecuadas en un formador lineal de gradientes.

Como catalizadores de la reacción de polimerización se utilizan, repartidos a partes iguales entre las dos soluciones, los reactivos:

- 220 μ l de persulfato amónico (10x).
- 32 μ l de TEMED.

Las condiciones de electroforesis son las siguientes:

Se cargan de 15 a 20 μ l de producto de PCR, que contienen de 1-2 μ l de tampón de carga 10x, en un gel de poliacrilamida al 8% (37.5:1; acrilamida:bis acrilamida) con gradiente lineal desnaturante, específico para cada uno de los exones de los distintos genes (100% desnaturante:urea 7M, formamida 40% v/v en tampón TAE 1x).

Cada electroforesis se deja correr durante toda la noche (16-18 h) a una temperatura de 50°C ó 60°C en todos los casos (tabla II), y un voltaje de 100V.

El revelado del gel se realiza con bromuro de etidio y, tras la tinción, se visualizaron las bandas de ADN con una lámpara de luz ultravioleta.

Se registra el resultado fotografiando el gel con una cámara fotográfica (Polaroid / película Polaroid Type 667) a la que se acopla un filtro naranja especial para fotografiar geles teñidos con bromuro de etidio y se visualizan con un transiluminador UV (302 nm).

La exposición adecuada en este caso es de f/16, 1/4 s.

III.4.3.2. Técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

La técnica de SSCP permite separar las cadenas desnaturizadas de la hebra de ADN debido a la conformación alternativa que adquieren en función de su secuencia primaria y bajo unas condiciones determinadas.

En este estudio se ha utilizado esta técnica para realizar el análisis de mutaciones en el exón 2A del gen NRL para el que, al no resolverse bien mediante la técnica de DGGE, se utilizó un protocolo de análisis de mutaciones distinto al empleado para los demás exones de los distintos genes estudiados:

1. Amplificar por PCR este exón con los cebadores adecuados (Tabla II).
2. Digerir con el enzima de restricción BglI (*Biolabs*), según las condiciones descritas en el apartado III.4.5. El fragmento amplificado tiene un tamaño de 268pb que, tras la reacción de digestión, da lugar a dos fragmentos de 141pb y 127pb respectivamente.
3. Añadir 6 μ l de tampón de carga de electroforesis por muestra.
4. Mezclar dos volúmenes de reacción con un volumen de solución desnaturizante (1 ml: 950 μ l de formamida, 2 μ l de NaOH y 50 μ l de tampón de carga).
5. Incubar a 94°C / 10 min. y depositar las muestras en hielo.
6. Cargar las muestras en el gel de poliacrilamida para iniciar la electroforesis.

El análisis electroforético de SSCP se realizó en las condiciones siguientes:

Gel de Acrilamida			Potencia	T ^a	Tiempo	
Acrilamida	Glicerol	T.B.E.	(W)	(°C)	(h)	
A)	8%	5%	0.5%	5W	ambiente	5
B)	10%	----	0.5%	5W	ambiente	5

El revelado del gel, tras la electroforesis, se realizó mediante la tinción con nitrato de plata.

Tinción de un gel de poliacrilamida con nitrato de plata:

1. Fijación: introducir el gel en un baño de EtOH 10% y agitar continuamente durante 5 min.
2. Oxidación: eliminar la solución EtOH 10% y añadir HNO₃ 1% (15,4 ml 65% / 1 L), agitar durante 3 min.
3. Retirar el ácido y aclarar dos veces con agua destilada durante unos segundos (un aclarado insuficiente deja un fondo de gel demasiado oscuro, debido a un exceso de precipitado sobre éste, que dificultará la resolución, así como un aclarado excesivo causará el efecto contrario dificultando también la detección).
4. Tinción con AgNO₃ (0,012 M; 2,02 g/L). Añadir la solución de nitrato de plata y mantener la agitación durante 20 min.
5. Reducción (revelado): retirar el AgNO₃ y añadir la solución reveladora (29,6 g de CO₃Na₂ 0,28 M/L; 540 µl de formaldehído 0,019%/L) y retirar rápidamente el precipitado de plata.
6. Repetir la operación hasta alcanzar la intensidad de tinción deseada y retirar entonces el revelador.
7. Añadir AcOH 10% y mantener durante 5 min. Esta solución detiene la reacción de precipitación de la plata.
8. Aclarar el gel con agua destilada. Resolver.

Se registra el resultado fotografiando el gel con una cámara fotográfica (Polaroid / película Polaroid Type 667) a la que se ha acoplado un filtro verde especial para fotografiar geles teñidos con nitrato de plata y visualizados con un transiluminador de luz blanca (400-700 nm). La exposición adecuada en este caso es de f/16, 1/30 s.

III.4.4. Secuenciación automática

III.4.4.1. Purificación del producto de PCR

El producto de PCR a purificar se hace correr en un gel de agarosa al 1.5% (aptdo.III.4.2.1.) de baja temperatura de fusión (Nusieve[®]GTG[®]agarose) en tampón TAE 1x. Finalizada la electroforesis visualizamos la banda correspondiente al fragmento de ADN a purificar con la ayuda de un transiluminador UV (302 nm) y se procede a extraer el ADN.

Para ello se ha utilizado el kit “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN), que recomienda seguir el siguiente protocolo:

1. Extraer la porción de gel que contiene la banda de ADN con la ayuda de un bisturí e introducir en un tubo de 1,5 ml. Exponer el mínimo tiempo posible el ADN a la radiación UV para evitar roturas (“nicks”) en la cadena de ADN.
2. Añadir 3 volúmenes de tampón QG por 1 volumen de gel (100 mg-100 μ l).
3. Incubar a 50°C durante 10 min. o hasta que la agarosa funda por completo (invertir el tubo cada 2-3 min. para facilitar la disolución).
4. Comprobar que el color de la mezcla es amarillo (el tampón QG contiene un indicador de pH). Si el color es naranja ó violeta, el pH es mayor de 7.5 y la adsorción del DNA a la membrana de la columna “QIAquick” no será eficaz. En este caso debe añadirse 10 μ l de acetato de sodio 3 M; pH 5.0 y agitar.
5. Añadir 1 volumen de isopropanol a la mezcla (100 mg de agarosa: 100 μ l de isopropanol).
6. Colocar la columna “QIAquick” en un tubo colector de 2 ml. Introducir la solución anterior en el interior de la columna. Centrifugar a 13000 r.p.m. / 1 min.
7. Desechar el contenido del tubo colector y volver a introducir la columna.
8. Añadir al interior de la columna 0,5 ml de tampón QG, para eliminar cualquier traza de agarosa. Centrifugar a 13000 r.p.m. / 1 min.

9. Añadir 0,75 ml de tampón PE (solución de EtOH) a la columna y dejar reposar de 2-5 min. antes de centrifugar a 13000 r.p.m. / 1 min.
10. Desechar el contenido del tubo colector y repetir la centrifugación para eliminar cualquier residuo de EtOH.
11. Introducir la columna en un tubo de 1,5 ml y añadir en el centro de ésta 50 ml de agua destilada para disolver el ADN. Centrifugar a 13000 r.p.m. / 1 min.

III.4.4.2. Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos de PCR, una vez detectado un patrón electroforético anormal, se ha realizado sobre ambos sentidos de la cadena de ADN, lo que nos ha permitido estar seguros de los resultados obtenidos. Ésta se ha realizado en un secuenciador automático Long-Read Tower™ System de la casa *Visible Genetics Inc.*

Para la reacción de secuencia se ha utilizado el kit de secuencia: “Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” (*Amersham Pharmacia Biotech*).

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

1. Marcar cuatro tubos de PCR “thin wall”, como **A, C, G, T** (“Termination Reaction”).
2. Añadir a cada uno de éstos 1 µl de su correspondiente mezcla de dNTP's / Cy5.5 ddNTP.
3. Preparar, por muestra, la siguiente solución madre:

- ADN (aprox. 200 ng)	hasta 24.0µl
- Tampón de reacción	3.5µl
- Cebador (1µM stock)	2.0µl
- “Thermo Sequenase” (ADN polimerasa)	2.0µl (20U)
- H ₂ O c.s.p.	31.5µl

➤ **Reacción Control:** preparar la misma solución madre anterior aunque en este caso añadimos:

- ADN control 4 μ l
- Cebador control (2 μ M) 1 μ l

4. Mezclar la solución madre.
5. Alicuotar 7 μ l de solución madre en cada uno de los cuatro tubos marcados en aptd.1.
6. Agitar cada tubo y centrifugar si es necesario. En nuestro caso no ha sido necesario añadir aceite mineral a la muestra ya que el termociclador empleado está dotado de una tapa térmica.
7. PCR (termociclador PTC Peltier Thermal Cyclers; *MJ Research, Inc.*): (95°C / 30 s.; 60°C / 30 s.; 72°C / 60-120 s.) x 30-60 ciclos.
8. Centrifugar si es necesario (si se observa producto de secuencia en las paredes del tubo) y dejar en hielo.

Tras la reacción de secuencia se eliminan los Cy5.5 ddNTP's no incorporados mediante una reacción de precipitación con etanol:

1. Añadir 2 μ l de Acetato Amónico 7.5 M + 30 μ l de EtOH 100% (aproximadamente 3 veces el volumen de la reacción).
2. Agitar en vortex. Incubar en hielo 20 min. (para la precipitación del ADN).
3. Centrifugar a 12000 r.p.m. / 20-30 min.
4. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 200 μ l de EtOH 70% frío.
5. Centrifugar a 12000 r.p.m. / 5 min., eliminar el sobrenadante y secar el precipitado a T^a ambiente / 2-3 min.
6. Resuspender el precipitado con 6 μ l de "Formamide Loading Dye" (proporcionada en el kit).
7. Agitar en vortex 10-20 s., hasta asegurar la completa resuspensión del precipitado y centrifugar ligeramente si es necesario.
8. Justo antes de correr las muestras en el gel, se desnaturalizan a 70°C / 2-3 min. y se dejan en hielo.
9. Correr de 1.5-2 μ l de muestra por carril.

III.4.5. Análisis con enzimas de restricción

Se han utilizado enzimas de restricción en los casos en los que la mutación detectada crea o destruye una diana de restricción, para comprobar la co-segregación de los polimorfismos y/o mutaciones encontrados con la enfermedad, dentro de una familia.

Las condiciones de digestión fueron, en todos los casos:

- Producto de PCR X
- Tampón (10x) 1x
- Enzima: 0,1x
- Agua c.s.p. Vfinal (=4X)

En el caso de que el producto de PCR a digerir contenga DMSO, añadido en la reacción de PCR (aptdo.III.4.2.), la cantidad de éste en la reacción de digestión no debe exceder el 2%, para que ésta se produzca de forma óptima. Esto limita, en algunos casos, el volumen de producto de PCR que se va a digerir.

El tampón y la temperatura óptimos requeridos tanto para realizar la digestión del fragmento como para inactivar el enzima vienen, en cada caso, determinados por el fabricante y se han empleado en todos los casos.

Tabla II. Cebadores y condiciones de PCR y DGGE empleados para el estudio genético directo de genes asociados a RPAD.

Cebadores	Gen	Tamaño (pb)	Gradiente¹ (%) / T^a	T^aanillamiento² (°C)
5'UTR Sense: 5'-ACAAGTCATGCAGAAGTTAG-3' Antisense: ³ GC-clamp-5'-GCTGCTCCCACCCAAGAA-3'	<i>RHO</i>	354	45-75 / 55°C	59
Exón 1A Sense: ³ GC-clamp-5'-CTGAGCTCAGGCCTTCGCAGCCAT-3' Antisense: 5'-GCTTCTTGTGCTGGACGGTGAC-3'	<i>RHO</i>	310	50-75 / 60°C	59
Exón 1B Sense: 5'-TCTGCTGATCGTGCTGGGCTT-3' Antisense: ³ GC-clamp-5'-GAGGGCTTTGGATAACATTG-3'	<i>RHO</i>	400	50-75 / 60°C	59
Exón 2 Sense: ³ GC-clamp-5'-GGCAGTGGGGTCTGTGCTGAC-3' Antisense: 5'-TCCTGACTGGAGGACCCTAC-3'	<i>RHO</i>	314	55-80 / 60°C	60
Exón 3 Sense: 5'-CTGTTCCAAGTCCCTCACA-3' Antisense: ³ GC-clamp-5'-CTGGACCCTCAGAGCCGTGA-3'	<i>RHO</i>	300	40-70 / 60°C	55
Exón 4 Sense: ³ GC-clamp-5'-CTGGAGGAGCCATGGTCTGGA-3' Antisense: 5'-CCTGGGAGTAGCTTGTCTT-3'	<i>RHO</i>	397	45-75 / 60°C	59
Exón 5 Sense: ³ GC-clamp-5'-CGTGCCAGTTCCAAGCACACTGTGG-3' Antisense: 5'- ACTTCGTTTATTCTGCACAGGCG-3'	<i>RHO</i>	320	50-80 / 60°C	59

Tabla II. Cebadores y condiciones de PCR y DGGE empleados para el estudio genético directo de genes asociados a RPAD (cont.).

Cebadores	Gen	Tamaño (pb)	Gradiente¹ (%) / T^a	T^aanillamiento² (°C)
Exón 1A Sense: ³ GC-clamp-5'-GGAAGCAACCCGGACTACAC-3' Antisense: 5'-TAGCCAGGTACGGCTTCAGC-3'	<i>RDS</i>	379	40-70 / 60°C	60
Exón 1B Sense: ³ GC-clamp-5'-ATTGCATGGAAGCCCTG-3' Antisense: 5'-TCTGACCCCAGGACTGGAAG-3'	<i>RDS</i>	379	40-70 / 60°C	60
Exón 2 Sense: ³ GC-clamp-5'-AAGCCCATCTCCAGCTGT-3' Antisense: 5'-CTTACCCTTACCCCCAGCTG-3'	<i>RDS</i>	353	45-75 / 60°C	63
Exón 3 Sense: 5'-AGATTGCCTCTAAATCTCCT-3' Antisense: 5'-GCAGTGCACTATTTCTCAGT-3'	<i>RDS</i>	294	SSCP	60
Exón 1A Sense: ³ GC-clamp-5'-TGGCATTAGCCCAGCTCAAG-3' Antisense: 5'-AGCCAGGAAGGTGCCAAGGT-3'	<i>ROM1</i>	303	45-75 / 60°C	60
Exón 1B Sense: ³ GC-clamp-5'-CGTCATCCTCCTCTGTAGT-3' Antisense: 5'-CTTGTAGTGAGCCAAGGCAGTC-3'	<i>ROM1</i>	377	50-80 / 60°C	60
Exón 1C Sense: 5'-TGGCTTTGCCTGGGAGTCTG-3' Antisense: ³ GC-clamp-5'-ATTCAAGGCAGCAGGAGG-3'	<i>ROM1</i>	332	45-75 / 60°C	60
Exón 2 Sense: ³ GC-clamp-5'-CCTCTATCTCCAGACATCCT-3' Antisense: 5'-GGAGGAGGTGTCAGATGCTT-3'	<i>ROM1</i>	364	45-75 / 60°C	63
Exón 3 Sense: ³ GC-clamp-5'-CTGACTCTCCCTGACTCTTT-3' Antisense: 5'-AGCCTTGTAAGGAGTTGTGAGGTT-3'	<i>ROM1</i>	371	40-70 / 60°C	60

Tabla II. Cebadores y condiciones de PCR y DGGE empleados para el estudio genético directo de genes asociados a RPAD (cont.).

Cebadores	Gen	Tamaño (pb)	Gradiente¹ (%) / T^a	T^aanillamiento² (°C)
Exón 1A Sense: 5'-CATAAGAAATCCGAATTCCAGCCCAGCTCCAGAATG-3' Antisense: 5'-TGCAGGGTAGCCAGCCAGTA-3'	<i>NRL</i>	268	SSCP	57.9
Exón 1B Sense: ³ GC-clamp-5'-GAGCTGTACTGGCTGGCTAC-3' Antisense: 5'-CCTCTCTTGGGCAGTCCTCCTTC-3'	<i>NRL</i>	235	55-80 / 60°C	58.4
Exón 2A Sense: ³ GC-clamp-5'-GACCCGGTTTCTGCTGCATTCTC-3' Antisense: 5'-GCGACAGGCCTGCGGTAGC-3'	<i>NRL</i>	179	75-100 / 60°C	60.3
Exón 2B Sense: ³ CG-clamp-5'-CTGAAGAACCGCGGCTAC-3' Antisense: 5'-AGCCCCACTACACCAAG-3'	<i>NRL</i>	250	55-80 / 60°C	61.2
Exón 1 Sense: ³ GC-clamp-5'-CCCCTGACTTGGGCCTCAGT-3' Antisense: 5'-TGCCAAGAGAAACGACTGTACT-3'	<i>CRX</i>	158	45-75 / 60°C	59
Exón 2 Sense: ³ GC-clamp-5'-GGATGGAATTCTTGGCATC-3' Antisense: 5'-CTCTTTGTTCCGGGCAGGC-3'	<i>CRX</i>	242	---	63
Exón 3A Sense: 5'-CCTCTTCCCCACTTACCC-3' Antisense: ³ GC-clamp-5'-TCAGGCAAAGGGGACTCT-3'	<i>CRX</i>	306	45-75 / 60°C	55
Exón 3B Sense: ³ GC-clamp-5'-GCTCCCCAACCCACGGCAGT-3' Antisense: 5'-CTGTAGGCGCCATAGCTCTG-3'	<i>CRX</i>	334	50-80 / 60°C	59

Tabla II. Cebadores y condiciones de PCR y DGGE empleados para el estudio genético directo de genes asociados a RPAD (cont.).

Cebadores	Gen	Tamaño (pb)	Gradiente¹ (%) / T^a	T^aanillamiento² (°C)
Exón 4A Sense: 5'-GTAATAACTCTGGAAGTACAA-3' Antisense: ³ GC-clamp-5'-GGACTATCTGAATCTTGCACTA-3'	<i>RP1</i>	350	40-60 / 50°C	59
Exón 4B Sense: 5'-CAGGTATCAAGATGGACAGC-3' Antisense: ³ GC-clamp-5'-TGAACCTTGGAATTTGAGTAG-3'	<i>RP1</i>	304	30-60 / 50°C	59

¹**DGGE; 100% desnaturizante:** 7M urea y 40% (vol/vol) de formamida en tampón TAE 1x. / T^a baño

²**PCR:** 94°C/4'; (94°C/30" ; Tanillamiento°C/30" ; 72°C/30") x40 ciclos; 72°C/8'

³**GC-clamp:**5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCGCCCG-3'

III.5. CLONACION

El protocolo seguido en el laboratorio, en líneas generales, para la obtención de plásmidos recombinantes mediante la utilización de técnicas de clonación ha sido el siguiente:

- a) Amplificar, mediante PCR (aptdo. III.4.2.), el inserto que va a ser clonado. Los cebadores y las condiciones de reacción empleados en cada caso se resumen en las tablas III y IV respectivamente.
- b) Aislar y purificar el inserto amplificado (aptdo. III.4.4.1.).
- c) Amplificar el vector comercial empleado en cada caso para obtener cantidad suficiente de éste y así poder realizar las reacciones posteriores (aptdo.III.5.1.6.)
- d) Realizar dobles digestiones enzimáticas (apartado III.4.5.) tanto en el inserto como en el vector, con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso para poder introducir el inserto en el vector adecuado y en la dirección deseada. Las enzimas utilizadas así como las construcciones plasmídicas formadas se resumen en la tabla IV.
Los extremos originados tras la digestión han sido en todos los casos protuberantes.
- e) Desfosforilación del vector (aptdo.III.5.1.4.). Se evita así el cierre intramolecular del vector anterior a la ligación del inserto.
- f) Ligación vector - inserto, de extremos cohesivos (aptdo.III.5.1.5.).
- g) Transformación en células competentes (aptdo.III.5.1.6.).
- h) Obtención de ADN plasmídico (aptdo.III.5.1.7.).
- i) Secuenciación automática del inserto (III.4.4.) para comprobar finalmente que la secuencia insertada es la correcta.

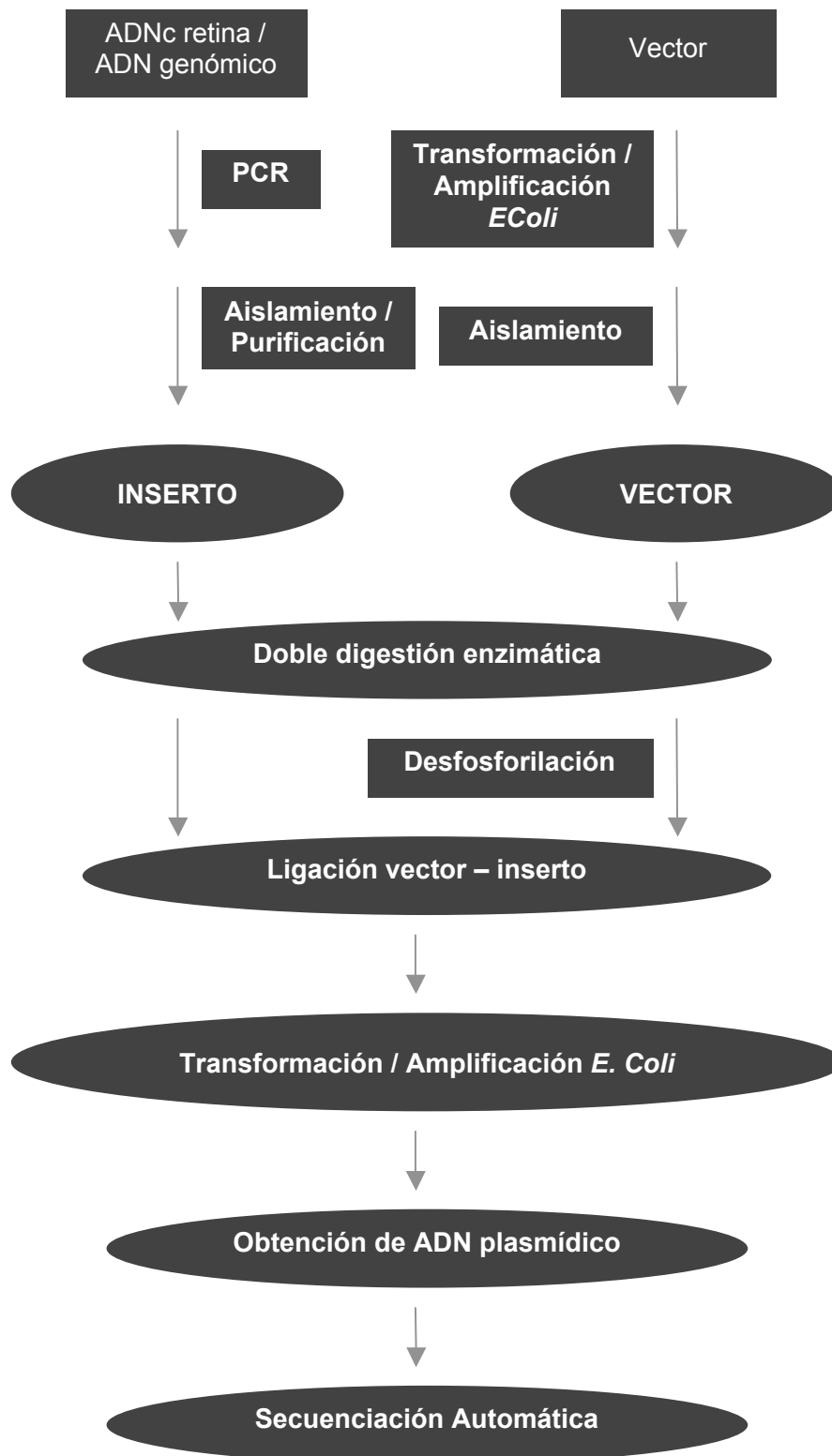


Figura 12. Esquema del protocolo seguido para la obtención de los plásmidos recombinantes que se describen a continuación.

III.5.1. Obtención del plásmido pGL3-P130

III.5.1.1. Obtención del inserto

1. Amplificar mediante PCR la región promotora, P130 (-130/+66), del gen RHO a partir de una secuencia genómica de este gen, según las condiciones que se indican en la tabla IV y empleando los cebadores indicados sobre la secuencia y detallados en la tabla III.

Región (-130 / +66) del promotor del gen RHO / Ref. NCBI: U16824

```

5041 GGTCCCTATT TCAAACCCAG GCCACCAGAC TGAGCTGGGA CCTTGGGACA
GACAAGTCAT

5101 GCAGAAGTTA GGGGACCTTC TCCTCCCTTT TCCTGGATGG ATCCTGAGTA
CCTTCTCCTC

5161 CCTGACCTCA GGCTTCCTCC TAGTGTACC TTGGCCCCTC TTAGAAGCCA
ATTAGGCCCT
PRHO130-F

5221 CAGTTTCTGC AGCGGGGATT AATATGATTA TGAACACCCC CAATCTCCCA
GATGCTGATT

5281 CAGCCAGGAG CTTAGGAGGG GGAGGTCACT TTATAAGGGT CTGGGGGGGT
CAGAACCCAG

5341 AGTCATCCAG CTGGAGCCCT GAGTGGCTGA GCTCAGGCCT TCGCAGCATT
CTTGGGTGGG
PRHO130-R

5401 AGCAGCCACG

```

2. Aislar y purificar los fragmentos amplificados tal y como se ha descrito en el apartado III.4.3.1.

III.5.1.2. Vector utilizado. Vector pGL3 - Enhancer (*Promega*)

Los vectores pGL3 están diseñados principalmente para el análisis cuantitativo de los factores que potencialmente regulan la expresión génica en los mamíferos. Estos factores pueden ser cis-activadores, como son los promotores y los potenciadores, o trans-activadores, como son los factores de unión al ADN.

Este vector carece de promotor eucariota permitiendo la máxima flexibilidad en la clonación de hipotéticas secuencias reguladoras de la transcripción. Este vector se ha utilizado para clonar el promotor del gen de la rodopsina. El vector presenta una secuencia modificada del ADNc del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* (luc^+) que nos permitirá monitorizar la actividad transcripcional en las células eucariotas transfectadas (“gen reporter”).

El vector pGL3-Enhancer contiene secuencias potenciadoras o “enhancer” del SV40 por debajo del gen luc^+ y la señal poly(A). Estas secuencias facilitan la verificación de la funcionalidad del promotor introducido ya que generalmente aumentan el nivel de transcripción del gen luc^+ .

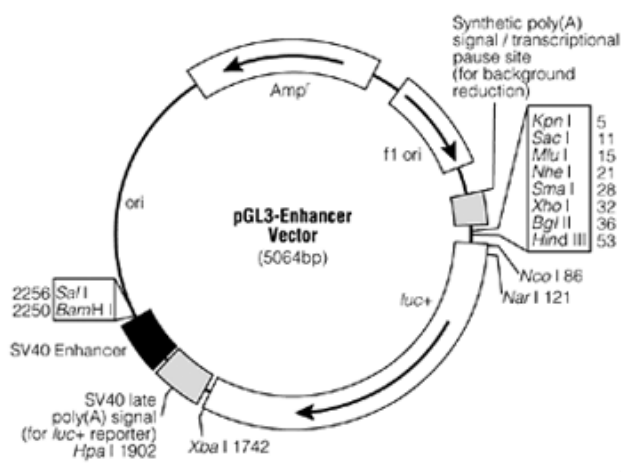


Figura 13. Mapa del vector pGL3-Enhancer. Este vector contiene un “polylinker” con dianas únicas de restricción como son Kpn I, Sac I, Mlu I, Nhe I, Sma I, Xho I, Bgl II y Hind III. La región promotora debe insertarse en este polylinker por encima del gen indicador de la luciferasa (luc^+).

III.5.1.2.1. Amplificación del vector

Para obtener mayores cantidades del vector comercial, se realiza una transformación directa de este vector en células *E. Coli* tal y como se describe más adelante en el apartado III.5.1.6.

Para aislar y purificar el vector de las células bacterianas, se ha realizado una “miniprep” tal y como se describe en el apartado III.5.1.7.

III.5.1.3. Digestión enzimática

Realizar una doble digestión enzimática tanto en el inserto como en el vector, con las enzimas de restricción Kpn I y Hind III (*Roche*) que permitirán introducir el inserto amplificado y purificado en el vector en la dirección deseada.

El protocolo de digestión con enzimas de restricción se describe en el apartado III.4.5.

Los extremos originados tras la digestión han sido en todos los casos protuberantes.

III.5.1.4. Desfosforilación del vector

Se evita así el cierre intramolecular del vector anterior a la ligación del inserto. Se utiliza la enzima fosfatasa alcalina, "SAP" (*Roche*). Ésta puede funcionar en el tampón de las enzimas de restricción.

1. Añadir 1 µl de fosfatasa alcalina.
2. Incubar a 37°C / 30 min.
3. Inactivar a 65°C / 15 min.

A pesar de la inactivación de las enzimas por temperatura es conveniente precipitar la muestra para evitar cualquier actividad residual de éstas tras la inactivación. Algunas enzimas de restricción no se inactivan por temperatura, lo que hace imprescindible la precipitación en esos casos.

Reacción de precipitación de ADN

1. Añadir, respecto al volumen de reacción de digestión, los siguientes reactivos:
 - NaCl (5 M) para obtener una concentración final de 0.3 M
 - 3 volúmenes de EtOH 100% (v:v)

2. Centrifugar a 13000 r.p.m / 30 min.
3. Decantar el sobrenadante.
4. Lavar el precipitado con 100 µl de EtOH 80%.
5. Centrifugar a 13000 r.p.m. / 10 min.
6. Decantar el sobrenadante.
7. Secar a 50°C / 5 min., para eliminar cualquier resto de EtOH.
8. Resuspender el ADN con 50 µl de H₂O o buffer TE. Añadir 30 µl si se requiere una disolución más concentrada.

III.5.1.5. Ligación, vector - inserto, de extremos cohesivos

Se ha utilizado el “Rapid DNA ligation Kit” (*Roche*):

1. Mezclar vector e inserto en una proporción de 1:3.
2. Disolver la mezcla de ligación con 2 µl de tampón “dilution buffer (5x)” hasta un volumen total de 10µl (1x).
3. Añadir 10µl de tampón “T4 DNA ligation buffer (2x)”.
4. Agitar suavemente la mezcla.
5. Añadir 2 µl de enzima “T4 DNA ligasa”.
6. Agitar suavemente.
7. Incubar a T^a ambiente / 5 min.
8. Si la reacción de ligación no es utilizada para la transformación directa de células competentes, puede guardarse a -20°C.

III.5.1.6. Transformación en células competentes

III.5.1.6.1. Cultivos bacterianos. Medios y condiciones empleados

Para realizar la clonación de los distintos plásmidos se ha empleado la cepa JM109 de *Escherichia Coli* (*Promega*). Son células ya competentes que presentan un mínimo de eficiencia de transformación de 1×10^8 cfu/µg de ADN control al ser plaqueado en placas con LB agar que contengan 100 µg/ml de ampicilina.

Las células han sido almacenadas a -80°C evitando grandes fluctuaciones de temperatura.

Los medios que se han empleado para crecer las células *E. Coli* han sido los siguientes:

Medio LB sólido

1. Disolver LB agar (Lennox L Agar / *Invitrogen*) en agua destilada (32 g/L).

LB (composición/L):	Triptona	10 g
pH 7	Extracto de levadura	5 g
	NaCl	10 g
	Bacto-Agar	15 g
	Agarosa	15 g

2. Autoclavar a 120°C / 20 min.
3. Añadir ampicilina sódica $50\ \mu\text{g/ml}$ (stock: $500\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$).
4. Repartir en placas de Petri (20 ml / placa).

Medio TB líquido

1. Disolver TB (Terrific Broth / *Gibco BRL*) en agua destilada (47g/L).

TB (composición/L):	Triptona	12 g
pH 7	Extracto de levadura	21 g
	Glicerol	4 ml

2. Autoclavar a 120°C / 20 min.
3. Añadir ampicilina sódica $50\ \mu\text{g/ml}$ (stock: $500\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

En todos los ensayos de clonación realizados en este trabajo se ha empleado el antibiótico ampicilina, añadido tanto en los medios sólidos (placas de Agar) como en los líquidos (TB), para la selección de colonias.

Condiciones de cultivo

Los cultivos de *E. Coli* tanto sólidos como líquidos se incuban a 37°C / 16-18 h. En el caso de los cultivos líquidos la incubación ha de ser en agitación constante para evitar la agregación celular que impediría su crecimiento normal.

III.5.1.6.2. Transformación

1. Transferir tantos viales como sean necesarios (un vial de células / transformación), almacenadas a -80°C , a hielo / 5 min.
2. Agitar suavemente el vial para resuspender bien la suspensión celular.
3. Añadir de 1-50 ng de ADN ($V \leq 10 \mu\text{l}$ / $100 \mu\text{l}$) a la suspensión celular.
4. Agitar suavemente la mezcla. Recordar, al añadir el ADN, no pipetear para evitar la rotura de células al pasar por la punta de pipeta.
5. Incubar en hielo / 10 min.
6. Realizar un choque térmico a 42°C / 45-50 s.
7. Incubar de nuevo en hielo / 2 min.
8. Añadir $900 \mu\text{l}$ de medio SOC o LB, a una T^{a} de 4°C , por transformación.
9. Incubar a 37°C / con agitación permanente de 225 r.p.m. / 60 min. La agitación durante este periodo es importante para evitar la agregación celular que impediría el inicio de crecimiento de las células.
10. Extender la suspensión en placas de Petri que contienen LB agar + Ampicilina ($50 \mu\text{g/ml}$).

III.5.1.7. Obtención de ADN plasmídico

III.5.1.7.1. “Mini-prep”

La purificación de ADN plasmídico a pequeña escala se ha realizado con el kit “QIAprep Miniprep Kit”/ *QIAGEN*.

1. “Picar” 5 o más colonias individuales de la placa de transformación (placa de petri). Transferir cada una de ellas a 4ml de medio TB + ampicilina ($50 \mu\text{g/ml}$) en un tubo de 10 ml. Incubar toda la noche a 37°C / fuerte agitación.
2. Transferir 1.5 ml de cada uno de los cultivos a un tubo de microcentrífuga (2 ml). Centrifugar a 12000 r.p.m. / 1 min.
3. Guardar el resto a 4°C . Para almacenar el cultivo durante más tiempo, añadir a la suspensión celular 15% Glicerol v/v y guardar a -70°C .

4. Decantar el sobrenadante y dejar secar el precipitado celular colocando los tubos boca abajo durante unos minutos (hasta observar el precipitado seco).
5. Resuspender el precipitado con la ayuda del vortex en 250 μ l de Solución P1 (a la que se ha añadido RNAasa A anteriormente) a 4°C.
6. Añadir 250 μ l de Solución P2 (Tampón de lisis). Agitar por inversión de 4 a 6 veces sin utilizar el vortex.
7. Añadir 350 μ l de Solución N3 (Tampón neutralizador / 4°C). Invertir el tubo de 4 a 6 veces.
8. Centrifugar a 12000 r.p.m. / 10 min. Transferir el sobrenadante a una columna "QIAprep".
9. Colocar la columna "QIAprep" en un tubo colector de 2 ml.
10. Centrifugar a 12000 r.p.m. / 30-60 s. Eliminar el contenido del tubo colector.
11. Opcional (paso necesario en caso de utilizar cepas con altos niveles de actividad nucleasa como la serie JM que hemos empleado en este trabajo). Añadir 0,5 ml de tampón de lavado PB y centrifugar a 12000 r.p.m. / 30-60 s. Eliminar el contenido del tubo colector.
12. Lavar la columna con 0,75 ml de Tampón PE. Centrifugar a 12000 r.p.m. / 30-60 s. Eliminar el contenido del tubo colector.
13. Centrifugar un minuto adicional a 12000 r.p.m. para eliminar cualquier resto de etanol del Tampón PE.
14. Colocar la columna "QIAprep" en un tubo de microcentrífuga (1,5ml) limpio. Añadir 50 μ l de Tampón EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) o H₂O, para eluir el ADN, sobre el centro de la columna; incubar 1min.
15. Centrifugar a 12000 r.p.m. / 1 min.

III.5.1.7.2. "Midi-prep"

Para obtener mayores cantidades de ADN plasmídico aumentamos el volumen de medio líquido TB + ampicilina (50 μ g/ml) de un precultivo de células *E. coli* que contienen el ADN plasmídico que queremos amplificar hasta 50 ml. Incubar a 37°C en agitación permanente a 250 r.p.m. (para evitar la agregación celular) durante toda la noche (12 h).

La purificación de ADN plasmídico se ha realizado con el kit “Hi Speed plasmid Purification Kit”/ *QIAGEN*.

1. Repartir los 50 ml de cultivo en tubos de 10 ml para poder centrifugar a 3000 x g / 15 min. y obtener el precipitado celular.
2. Resuspender los precipitados en 6 ml de Tampón P1 / 4°C (Tampón de resuspensión; 50 mM Tris·Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNasa A) y unificarlos en un mismo recipiente.
3. Añadir 6 ml de Tampón P2 (Tampón de lisis; 200 mM NaOH; 1% SDS). Agitar por inversión de 4 a 6 veces. Incubar a T^a ambiente / 5 min.
4. Añadir 6 ml de Tampón P3 / 4°C (Tampón de neutralización; 3.0 M acetato potásico, pH 5.5) y mezclar suave y rápidamente por inversión de 4 a 6 veces. En caso de observar excesiva viscosidad mezclar más la disolución hasta neutralizarla por completo.
5. Colocar un tapón en la base para que no caiga el filtrado, transferir rápidamente el lisado a la jeringa / columna “QIAfilter Cartridge”, incubar a T^a ambiente /10 min.
6. Debe observarse un agregado blanco en la parte superior del lisado que contiene proteínas, ADN genómico y detergente. Si no se observa, pasar una punta por las paredes de la columna para despegarlo.
7. Equilibrar la jeringa / columna “Hi Speed Midi Tip” con 4 ml de Tampón QBT (Tampón de equilibrado; 50 mM MOPS, pH 7.0; 750 mM NaCl; 15% isopropanol; 0.15% Triton® X-100) y dejar que éstos caigan por gravedad.
8. Quitar el tapón al “QIAfilter Cartridge”, introducir el émbolo y suavemente filtrar el lisado en el interior de la “Hi Speed Midi Tip” (ya equilibrada).
9. Esperar que el lisado pase a través de la resina por gravedad.
10. Lavar con 20 ml de Tampón QC (Tampón de lavado; 50 mM MOPS, pH 7.0; 1.0 M NaCl; 15% isopropanol). Dejar caer por gravedad.
11. Eluir el ADN con 5 ml de Tampón QF (Tampón de elución; 50 mM Tris·Cl, pH 8.5; 1.25 M NaCl; 15% isopropanol) recoger en un tubo con capacidad mínima de 10 ml. En este punto puede pararse el proceso, durante una noche, guardando la muestra a 4°C.

12. Precipitar el ADN con 3,5 ml de isopropanol (0,7 volúmenes). Agitar e incubar a T^a ambiente / 5 min. (evitar tiempos superiores que provocarían la formación de sales).
13. Mientras tanto, retirar el émbolo de una jeringa de 20 ml (sin filtro), colocar el disco "QIA precipitator".
14. Transferir la muestra eluída con el isopropanol a la jeringa de 20 ml, insertar el émbolo y filtrar la solución aplicando una presión constante.
15. Retirar el disco, retirar el émbolo, volver a colocar el disco, volver a colocar el émbolo y secar la membrana pasando aire por el disco (es importante seguir este orden para evitar la presión de vacío del émbolo).
16. Secar la punta del disco con papel de filtro para evitar el arrastre de isopropanol.
17. Retirar el émbolo de una jeringa de 5 ml (sin filtro), colocar el disco, añadir 1ml de Tampón TE (10 mM Tris·Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA), introducir el émbolo y eluir el ADN en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml a presión constante.
18. Repetir el paso anterior dos veces, la primera volviendo a pasar la solución eluida por el disco y la segunda con la jeringa vacía para recoger cualquier resto de muestra residual en el disco.

III.5.1.7.3. Determinación de la concentración de ADN

Se determina la concentración en un espectrofotómetro de luz UV, midiendo la absorbancia a 260 nm de una alícuota del ADN obtenido. Una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 50 µg/ml (ADN doble cadena).

El máximo de absorción de las proteínas se da a 280nm, así la determinación del ratio A_{260} / A_{280} determina la pureza de la muestra en relación a la contaminación proteica de ésta. Ratios de 1,8 – 2,0 indican un elevado grado de pureza del ADN.

III.5.1.7.4. Comprobación de secuencias

Una vez finalizado el proceso de obtención de los dos plásmidos se realiza una secuenciación automática, tal y como se ha descrito en el apartado III.4.4., del inserto que contienen para asegurar que la secuencia nucleotídica es la correcta y que no se han introducido mutaciones no deseadas durante el proceso.

III.5.2. Clonación del gen NRL. Obtención del plásmido pUC-NRL

Este plásmido ha sido utilizado para realizar un paso intermedio en el proceso de obtención del plásmido pCI-NRL51 (aptdo. III.5.4.).

III.5.2.1. Obtención del inserto

1. Se ha amplificado, mediante PCR, la secuencia codificante del gen NRL. Para la reacción de PCR partimos de 2µl de ADNc procedente de una mezcla de poly A+ RNA de retina de mujeres y hombres de raza caucásica, comercializado por la casa *Clontech*. Los cebadores empleados, que se indican sobre la secuencia (más abajo), se detallan junto con las condiciones de reacción en las tablas III y IV respectivamente.

Gen NRL (cds) / Ref. NCBI: NM_006177

```

1  GAGCTGAGCAGAGGCCACCAGGCCCTGCTCCATGGAGCCTTCAGTCTCCTGGGAAGCTGTG
61  CCTGTCTGGCTCTGGCACTGACCACATCCTCTCGGCCATTTCTGAAGTGCACCTCCCTCCA
121  GCCCAGCTCCAGATGGCCCTGCCCCAGCCCTGGCCATGGAATATGTCAATGACTT
    MNRL-F.....M--A--L--P--P--S--P--L--A--M--E--Y--V--N--D--F
181  TGACTTGATGAAGTTTGAAGTAAAGCGGGAACCCCTCTGAGGGCCGACCTGGCCCCCTAC
    16  --D--L--M--K--F--E--V--K--R--E--P--S--E--G--R--P--G--P--P--T
241  AGCCTCACTGGGCTCCACACCTTACAGCTCAGTGCCTCCTTACCCACCTTCAGTGAACC
    36  --A--S--L--G--S--T--P--Y--S--S--V--P--P--S--P--T--F--S--E--P
301  AGGCATGGTGGGGCAACCGAGGGCACCCGGCCAGGCCTGGAGGAGCTGTACTGGCTGGC
    56  --G--M--V--G--A--T--E--G--T--R--P--G--L--E--E--L--Y--W--L--A
361  TACCCTGCAGCAGCAGCTGGGGGCTGGGGAGGCATTGGGGCTGAGTCTTGAAGAGGCCAT
    76  --T--L--Q--Q--Q--L--G--A--G--E--A--L--G--L--S--P--E--E--A--M
421  GGAGCTGCTGCAGGGTCAGGGCCAGTCCCTGTTGATGGGCCCCATGGCTACTACCCAGG
    96  --E--L--L--Q--G--Q--G--P--V--P--V--D--G--P--H--G--Y--Y--P--G
481  GAGCCCAGAGGAGACAGGAGCCCAGCACGTCCAGCTGGCAGAGCGGTTTTCCGACGCGGC
    116  --S--P--E--E--T--G--A--Q--H--V--Q--L--A--E--R--F--S--D--A--A
541  GCTGGTCTCGATGTCTGTGCGGGAGCTAAACCGGCAGCTGCGGGGCTGCGGGCGCGACGA
    136  --L--V--S--M--S--V--R--E--L--N--R--Q--L--R--G--C--G--R--D--E
601  GGCGCTGCGGCTGAAGCAGAGGCGCGCACGCTGAAGAACCGCGGCTACGCGCAGGCCTG
    156  --A--L--R--L--K--Q--R--R--R--T--L--K--N--R--G--Y--A--Q--A--C
661  TCGCTCCAAGCGGCTGCAGCAGCGCGCGGGCTGGAGGCCGAGCGGCCCGCCTGGCCCG
    176  --R--S--K--R--L--Q--Q--R--R--G--L--E--A--E--R--A--R--L--A--A

```

```

721 CCAGCTGGACGCGCTGCGGGCCGAGGTGGCCCCGCTGGCCCCGGGAGCGCGATCTCTACAA
196 --Q--L--D--A--L--R--A--E--V--A--R--L--A--R--E--R--D--L--Y--K

781 GGCTCGCTGTGACCGGCTAACCTCGAGCGGCCCGGGTCCGGGGACCCCTCCACCTCTT
216 --A--R--C--D--R--L--T--S--S--G--P--G--S--G--D--P--S--H--L--F

841 CCTCTGAGCCGTTTCAGAGCACCTTGTGGTGTAGTGGGGGCTGGGTGGGGTGGCTCCGCC
236 --L--*--.....MMNRL-R.....

901 AGGAGGGCGGTGCACGGTTCTCTGCATCGTTACCAGAGCGCCTTCTGGTCCTAGCCACGC
961 CCTGTATGACCGCGCAAATATCCCCAAAGCTTTGGGTCTCAAGTCATGCCGAATTTA
    
```

* El cambio de color (negro/azul) de los nucleótidos indica un cambio de exón.

2. Aislar y purificar el fragmento amplificado tal y como se ha descrito en el apartado III.4.4.1.

III.5.2.2. Vector utilizado. Vector pUC18 (Invitrogen)

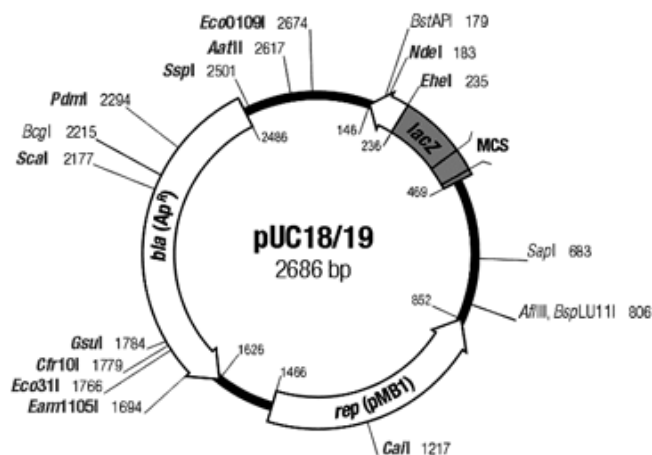


Figura 14. Mapa del vector pUC18. Este vector contiene un “polylinker” (MCS) con dianas únicas de restricción como son EcoR I, Sac I, Kpn I, Sma I, BamH I, Xba I, Sal I, Pst I, Sph I y Hind III.

Los vectores pUC contienen un “polylinker” que agrupa un elevado número de dianas de restricción, un gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación derivado de pBR322 ligado a una porción del gen LacZ de *E. Coli*.

Este vector permite la clonación de fragmentos de ADN doblemente digeridos, en ambas direcciones con respecto al promotor *lac* / α -péptido *lac* Z. Así las colonias recombinantes pueden ser identificadas, en presencia de X-gal en la placa (galactósido cuyo color cambia de incoloro a azul en presencia de β -galactosidasa), ya que son incoloras mientras que las que no contengan el inserto presentan una coloración azul.

Los vectores pUC son de tamaño pequeño (2686 pb) y son fácilmente introducidos en *E.Coli* por transformación.

III.5.1.2.1. Amplificación del vector

Para obtener mayores cantidades del vector comercial, se realiza una transformación directa de éste vector en células *E. Coli* tal y como se describe en el apartado III.5.1.6.2.

Para aislar y purificar el vector de las células bacterianas, se ha realizado una “miniprep” tal y como se describe en el apartado III.5.1.7.1.

III.5.2.3. Digestión enzimática

Realizar una doble digestión enzimática tanto en el inserto como en el vector, con las enzimas de restricción EcoR I y Sal I (*Fermentas*) que permitirán introducir el inserto amplificado y purificado en el vector en la dirección deseada.

El protocolo de digestión con enzimas de restricción se describe en el apartado III.4.5.

Los extremos originados tras la digestión han sido en todos los casos protuberantes.

III.5.2.4. Ligación y transformación

La finalización del proceso se realiza tal y como se ha descrito desde el apartado III.5.1.4. hasta el III.5.1.7 siguiendo el mismo orden.

III.5.3. Mutagénesis dirigida mediante PCR

Obtención del plásmido pUC-NRL51

Para introducir la mutación Pro51Leu sobre la secuencia de ADNc del gen NRL en estado salvaje (WT) se ha utilizado el método de mutagénesis dirigida por PCR.

Este método se basa en la capacidad de algunas ADN polimerasas de última generación de sintetizar plásmidos enteros empleando dos cebadores totalmente complementarios que contienen la mutación que se quiere introducir en la secuencia.

El plásmido utilizado para introducir la mutación ha de ser lo más pequeño posible, para facilitar la reacción de PCR. Este es el motivo por el que se ha utilizado el vector pUC18 para clonar el gen NRL (WT) (apdo.III.5.2.) en lugar de emplear directamente el vector escogido para los experimentos de transfección, pCI-neo, de tamaño muy superior al primero.

Para la síntesis del par de cebadores mutados (Tabla III) deben tenerse en cuenta las siguientes consideraciones: el tamaño aconsejado está entre 25-45 nucleótidos; la mutación debe localizarse hacia la mitad del cebador; debe existir complementariedad total entre ellos; deben terminar en uno o varios residuos G o C (para facilitar su hibridación con el plásmido).

La segunda clave de esta técnica es la utilización de la enzima de restricción DpnI, capaz de cortar únicamente ADN metilado o hemimetilado (Gm6ATC) por la Dam metilasa de E. Coli.

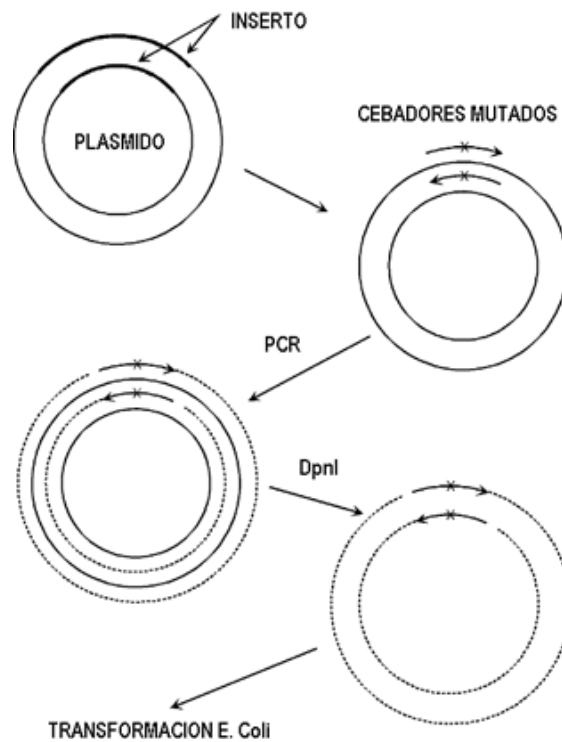


Figura 15. Mutagénesis dirigida por PCR.

El protocolo seguido para la obtención del plásmido pUC-NRL51 es el siguiente:

1. Utilizando como molde el plásmido pUC-NRL (aptdo.III.5.2.), realizar una reacción de PCR utilizando los cebadores descritos en la tabla III y con las condiciones de reacción detalladas en la tabla IV.
2. Añadir, directamente sobre el producto de PCR obtenido, 1 μ l de enzima de restricción DpnI e incubar a 37°C / 1 h.
3. La enzima DpnI eliminará el ADN paterno no mutado (metilado) y los heterodúplex mutante-salvaje (hemimetilados).
4. Aislar y purificar el plásmido no digerido según se ha descrito en el apartado III.4.4.1.
5. Transformar el plásmido obtenido (contiene la mutación), pUC-NRL51, en células *E. Coli* siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.5.1.6.

6. Obtener el ADN plasmídico realizando un “miniprep” tal y como se ha descrito en el apartado III.5.1.7.1.
7. Secuenciar automáticamente, tal y como se describe en el apartado III.4.4., el gen NRL mutado que contiene el plásmido para comprobar que la mutación Pro51Leu se ha introducido correctamente y que no se han introducido otras mutaciones no deseadas a lo largo del proceso.

III.5.4. Obtención del plásmido pCI-NRL51

III.5.4.1. Doble digestión del plásmido pUC-NRL51

Se ha realizado una doble digestión con las enzimas de restricción EcoRI y Sall (Tabla IV), para separar el vector del inserto siguiendo el protocolo de digestión con enzimas de restricción descrito en el apartado III.4.5.

III.5.4.2. Aislamiento y purificación del inserto NRL51

Se ha aislado y purificado el inserto mutado según el protocolo descrito en el apartado III.4.4.1.

III.5.4.3. Vector utilizado. Vector pCI-neo (*Promega*)

Este vector de expresión eucariota, contiene la región promotora y amplificadora del citomegalovirus humano (CMV) por encima de la zona de clonación permitiendo así la expresión constitutiva del inserto de ADN clonado en células eucariotas.

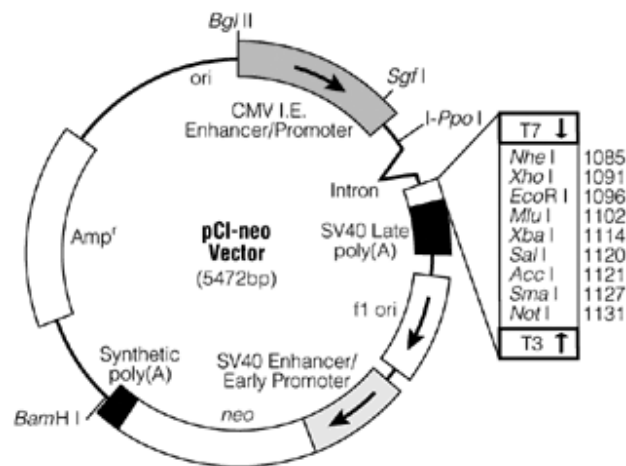


Figura 16. Mapa del vector pCI-neo. Este vector contiene un “polylinker” con dianas únicas de restricción como son Nhe I, Xho I, EcoR I, Mlu I, Xba I, Sal I, Acc I, Sma I y Not I. En este “polylinker” debe insertarse el gen, cuya actividad moduladora transcripcional queremos averiguar, en la dirección correcta.

III.5.4.4. Digestión enzimática

Al coincidir las dianas de restricción, EcoR I / Sal I (*Fermentas*), empleadas para clonar el gen NRL (WT) sobre el vector pCI-neo con las empleadas para realizar la clonación del mismo gen sobre el vector pUC-18, no es necesario volver a digerir el inserto NRL51.

Realizar una doble digestión del vector con estas enzimas, que permitirá introducir el inserto amplificado y purificado en el vector en la dirección deseada.

El protocolo de digestión con enzimas de restricción se describe en el apartado III.4.5.

III.5.4.5. Ligación y transformación

La finalización del proceso se realiza tal y como se ha descrito desde el apartado III.5.1.4. hasta el III.5.1.7 siguiendo el mismo orden.

III.5.5. Obtención del plásmido pCI-NRL122

III.5.5.1. Obtención del inserto NRL122

Para introducir la mutación Gly122Glu sobre el ADNc del gen NRL en estado salvaje (WT), se han utilizado también un par de cebadores complementarios entre sí y mutados pero, en este caso, el mutante se ha obtenido realizando dos PCR consecutivas.

1. Reacciones de PCR.

Para la primera PCR se ha empleado como molde el gen NRL amplificado desde ADNc de retina, ya aislado y purificado (este paso se ha descrito en el apartado III.4.2.), y como cebadores dos combinaciones:

1ª PCR→ Molde: ADNc del gen NRL (WT)
Cebadores: MMNRL-F / NRL122-R→ producto A
NRL122-F / MMNRL-R→ producto B

Para la segunda PCR se ha empleado como molde una mezcla de los productos de la PCR anterior y los dos cebadores complementarios a los extremos del ADNc del gen NRL:

2ª PCR→ Molde: A+B
Cebadores: MMNRL-F / MMNRL-R→ NRL122

Las condiciones de PCR y los cebadores empleados en ambos casos se detallan en las tablas III y IV. Las condiciones de PCR han sido las mismas para ambas reacciones salvo para la obtención del producto B, en el que ha sido necesario añadir DMSO (10%) en la reacción.

2. Aislar y purificar el gen amplificado tal y como se ha descrito en el apartado III.4.4.1.

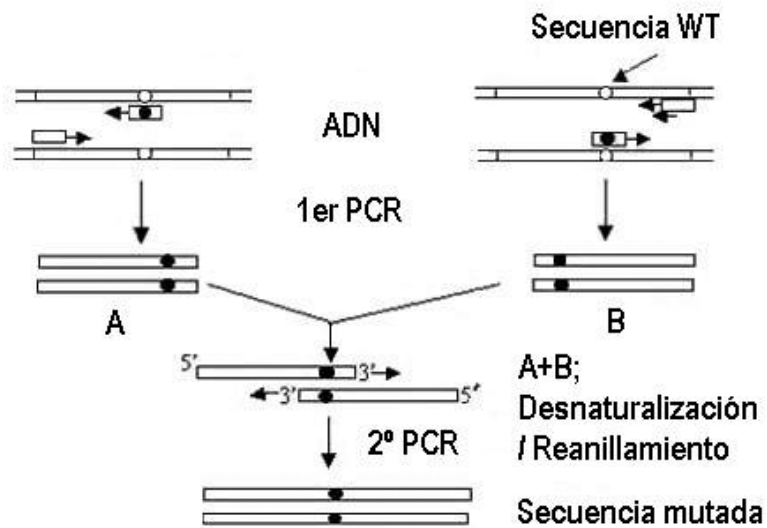


Figura 17. Introducción de una mutación puntual realizando dos PCR consecutivas y combinando los dos cebadores externos del inserto con dos cebadores complementarios que contienen la mutación a introducir.

III.5.5.2. Vector utilizado. Vector pCI-neo (Promega)

El mapa del vector junto con su descripción se detalla en el apartado III.5.4.3.

III.5.5.3. Digestión enzimática

Se ha realizado una doble digestión enzimática tanto en el inserto como en el vector, con las enzimas de restricción EcoR I y Sal I (*Fermentas*) que permiten introducir el inserto amplificado y purificado en el vector en la dirección deseada.

El protocolo de digestión con enzimas de restricción se describe en el apartado III.4.5.

III.5.5.4. Ligación y transformación

La finalización del proceso se realiza tal y como se ha descrito desde el apartado III.5.1.4. hasta el III.5.1.7 siguiendo el mismo orden.

III.5.6. Clonación del gen CRX

Obtención del plásmido pCI-CRX

III.5.6.1. Obtención del inserto

1. Amplificar, mediante PCR, la secuencia codificante del gen CRX. Para la reacción de PCR partimos de 2 µl de ADNc procedente de una mezcla de poly A+ RNA de retina de mujeres y hombres de raza caucásica, comercializado por la casa *Clontech*.

Los cebadores empleados, que se indican sobre la secuencia (más abajo), se detallan junto con las condiciones de reacción en las tablas III y IV respectivamente.

Gen CRX (cds)* / Ref. NCBI.: NM_000554

```

..CRX-CLONF2
1  ATGATGGCGTATA TGAACCCGGGGCCCACTATTCTGTCAACGCCTTGCCCTAAGTGGC
1  -M--M--A--Y--M--N--P--G--P--H--Y--S--V--N--A--L--A--L--S--G-

61  CCCAGTGTGGATCTGATGCACCAGGCTGTGCCCTACCCAAGCGCCCCCAGGAAGCAGCGG
21  -P--S--V--D--L--M--H--Q--A--V--P--Y--P--S--A--P--R--K--Q--R-

121  CGGGAGCGCACCCACCTTCACCCGGAGCCAACCTGGAGGAGCTGGAGGCACTGTTTGCCAAG
41  -R--E--R--T--T--F--T--R--S--Q--L--E--E--L--E--A--L--F--A--K-

181  ACCCAGTACCCAGACGTCTATGCCCGTGAGGAGGTGGCTCTGAAGATCAATCTGCCTGAG
61  -T--Q--Y--P--D--V--Y--A--R--E--E--V--A--L--K--I--N--L--P--E-

241  TCCAGGGTTCAGGTTTGGTTCAAGAACCGGAGGGCTAAATGCAGGCAGCAGCGACAGCAG
81  -S--R--V--Q--V--W--F--K--N--R--R--A--K--C--R--Q--Q--R--Q--Q-

301  CAGAAACAGCAGCAGCAGCCCCAGGGGGCCAGGCCAAGGCCCGGCCTGCCAAGAGGAAG
101  -Q--K--Q--Q--Q--Q--P--P--G--G--Q--A--K--A--R--P--A--K--R--K-

361  GCGGGCAGCTCCCAAGACCCCTCCACAGATGTGTGTCCAGACCCCTCTGGGCATCTCAGAT
121  -A--G--T--S--P--R--P--S--T--D--V--C--P--D--P--L--G--I--S--D-

421  TCCTACAGTCCCCCTCTGCCCGGCCCTCAGGCTCCCCAACCACGGCAGTGGCCACTGTG
141  -S--Y--S--P--P--L--P--G--P--S--G--S--P--T--T--A--V--A--T--V-

481  TCCATCTGGAGCCCAGCCTCAGAGTCCCTTTGCCTGAGGCGCAGCGGGCTGGGCTGGTG
161  -S--I--W--S--P--A--S--E--S--P--L--P--E--A--Q--R--A--G--L--V-

541  GCCTCAGGGCCGTCTCTGACCTCCGCCCCCTATGCCATGACCTACGCCCGGCCTCCGCT
181  -A--S--G--P--S--L--T--S--A--P--Y--A--M--T--Y--A--P--A--S--A-

601  TTCTGCTCTTCCCCCTCCGCCTATGGGTCTCCGAGCTCCTATTTTCAGCGGCCTAGACCCC
201  -F--C--S--S--P--S--A--Y--G--S--P--S--S--Y--F--S--G--L--D--P-

661  TACCTTTCTCCCATGGTGCCCCAGCTAGGGGGCCCGGCTCTTAGCCCCCTCTTGGCCCC

```

```

221 -Y--L--S--P--M--V--P--Q--L--G--G--P--A--L--S--P--L--S--G--P-
721 TCCGTGGGACCTTCCCTGGCCAGTCCCCACCTCCCTATCAGGCCAGAGCTATGGCGCC
241 -S--V--G--P--S--L--A--Q--S--P--T--S--L--S--G--Q--S--Y--G--A-
781 TACAGCCCCGTGGATAGCTTGAATTC AAGGACCCACGGGCACCTGGAAATTCACCTAC
261 -Y--S--P--V--D--S--L--E--F--K--D--P--T--G--T--W--K--F--T--Y-
841 AATCCCATGGACCCTCTGGACTACAAGGATCAGAGTGCCTGGAAGTTTCAGATCTTGTAG
280 -N--P--M--D--P--L--D--Y--K--D--Q--S--A--W--K--F--Q--I--L--*-
... .CRXCLON-R

```

* El cambio de color (negro/azul) de los nucleótidos indica un cambio de exón.

2. Aislar y purificar el fragmento amplificado tal y como se ha descrito en el apartado III.4.4.1.

III.5.6.2. Vector utilizado. Vector pCI-neo (*Promega*)

El mapa del vector junto con su descripción se detalla en el apartado III.5.4.3.

III.5.6.3. Digestión enzimática

Se ha realizado una doble digestión enzimática tanto en el inserto como en el vector, con las enzimas de restricción Xho I y Sal I (*Fermentas*) que permiten introducir el inserto amplificado y purificado en el vector en la dirección deseada. El protocolo de digestión con enzimas de restricción se describe en el apartado III.4.5.

III.5.6.4. Ligación y transformación

La finalización del proceso se realiza tal y como se ha descrito desde el apartado III.5.1.4. hasta el III.5.1.7 siguiendo el mismo orden.

III.5.7. Clonación directa de un fragmento de PCR (TA-Cloning)

En los casos en los que la caracterización de una determinada mutación mediante la secuenciación directa de un producto de PCR resulta complicada o poco resolutive (deleciones o inserciones en heterocigosis por ejemplo) se ha empleado la técnica de TA-cloning. De esta forma, al subclonar el producto de PCR en células bacterianas se facilita la posterior lectura de la secuencia mutada de ADN en homocigosis.

Para estos casos se ha utilizado el sistema “TOPO® Cloning” (TOPO® XL PCR Cloning Kit; *Invitrogen*) que aprovecha la actividad terminal transferasa de algunas enzimas Taq polimerasas (utilizada en la reacción de PCR), que añade un solo residuo deoxiadenuina (A) al extremo 3' de los productos de PCR.

El kit proporciona un vector linealizado que contiene a su vez, en sus extremos 3', un residuo deoxitimidina (T) y una topoisomerasa I que facilitará la ligación del inserto de PCR con el vector.

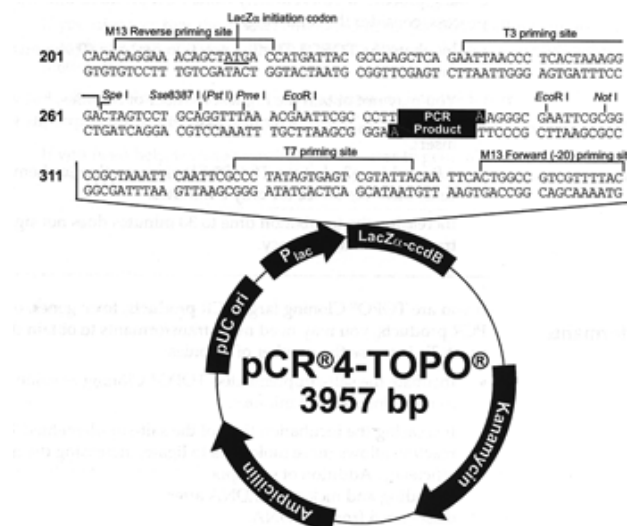


Figura 18. Mapa del vector pCR[®]4-TOPO[®]. El inserto de PCR interrumpe el gen LacZ- α permitiendo la selección azul / blanca de las colonias, en presencia de X-gal.

Reacción TOPO®Cloning:

1. Producto de PCR (preferiblemente reciente) 0.5-4 μ l
2. Sal (solución 1.2M NaCl; 0.06M MgCl₂) 1 μ l
3. H₂O c.s.p. 5 μ l
4. TOPO vector 1 μ l
5. Mezclar e incubar a T^aambiente / 5 min. Puede guardarse a -20°C o realizar directamente la transformación de células competentes (aptdo.III.5.1.6.).

Para los ensayos de TA-cloning se han utilizado las células proporcionadas por la casa comercial en el kit TOPO® XL PCR Cloning Kit (*Invitrogen*), "One Shot® TOP10 Chemically Competent *E.coli*". Estas células competentes presentan una eficiencia de transformación $>1 \times 10^9$ cfu/ μ g de ADN control al ser plaqueado en placas con LB agar que contengan 100 μ g/ml de ampicilina. Las células han sido almacenadas a -80°C evitando grandes fluctuaciones de temperatura.

"Picar" 5 o más colonias individuales de la placa de transformación (placa de petri). Transferir cada una de ellas a 4 ml de medio TB + ampicilina (50 μ g/ml) en un tubo de 10ml. Incubar toda la noche a 37°C / fuerte agitación.

Realizar una PCR (aptdo.III.4.2.), con las condiciones específicas del inserto que se haya clonado, descritas en la tabla II, tomando como muestra 2 μ l del propio cultivo.

Tras amplificar, seleccionamos las muestras homocigotas mutadas con la técnica de DGGE (aptdo.III.4.3.1.) y, una vez localizadas, secuenciamos (aptdo.III.4.4.) el producto de PCR obtenido anteriormente y purificado (aptdo.III.4.4.1.) para caracterizar la mutación de que se trate.

Tabla III. Cebadores empleados en los experimentos de clonaje.

Inserto	Cebadores (Dianas de Inserción)
<i>RHO (- 130/+66)</i>	<p>PRHO-130F: 5'-<u>CCCGGGAAGGTACCGAGCTCACGCGTCA</u> ATTAGGCCCTCAGTTTCT-3' KpnI</p> <p>PRHO-130R: 5'-CGACGCGTCTCGAGAGATCTA<u>AAGCTT</u>GC TGCTCCCAACCAAGAA-3' HindIII</p>
<i>NRL</i>	<p>MMNRL-F: 5'-CATAAGAAATCCGA<u>ATTCC</u>AGCCCAGCTC CAGAATG-3' EcoRI</p> <p>MMNRL-R: 5'-CAAGTCTCTATGGAGCTCGT<u>CGAC</u>CAGCC CCCACTACACCACAAG-3' Sall</p>
<i>CRX</i>	<p>CRXCLON-F2: 5'-CAAAATATTCC<u>CTCGAGA</u>AAGATCATG ATGGCGTATAT-3' XhoI</p> <p>CRXCLON-R: 5'-ACGCGTCTAGAGT<u>CGAC</u>CCGATGGAG AGAGATGGAGACT-3' Sall</p>
Plásmido	Cebadores Mutagénesis
<i>pCI-NRL51</i>	<p>NRL51-F: 5'-TGCCTCCTTCACTCACCTTCAG-3'</p> <p>NRL51-R: 5'-CTGAAGGTGAGTGAAGGAGGCA-3'</p>
<i>pCI-NRL122</i>	<p>NRL122-F: 5'-AGGAGACAGA<u>AAGCC</u>CAGCACGT-3'</p> <p>NRL122-R: 5'-ACGTGCTGGGCTTCTGTCTCCT-3'</p>

III.6. EXPRESION GENICA

El protocolo seguido en el laboratorio, en líneas generales, para la realización de los experimentos de expresión génica ha sido el siguiente:

- a) Puesta a punto de la línea celular empleada para los experimentos de transfección.
- b) Transfección transitoria de las construcciones plasmídicas descritas en el apartado III.5.
- c) Lectura de los resultados de la transfección.

III.6.1. Cultivo de células eucariotas

III.6.1.1. Descripción y características de la línea celular

La línea celular empleada para los estudios de transactivación del promotor del gen de la rodopsina ha sido la línea de células de mamífero COS-7, cedida por la Dra. Bellón (Hospital Universitario La Paz / Madrid).

Se trata de una línea originaria de células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), CV-1, transformadas con un mutante del virus SV40 de simios sin origen de replicación, que provoca la expresión del antígeno T que conduce a la célula a su malignificación.

Son células adherentes, tipo fibroblastos.

III.6.1.2. Condiciones de crecimiento de la línea celular

La línea celular COS-7 presenta un crecimiento en monocapa (las células se adhieren al sustrato y en esa forma inician la proliferación) en las siguientes condiciones:

Sustrato: placas de polipropileno (p6 / 35mm - p100 / 100mm).

Medio de cultivo:

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium / 4.5 g/L L-Glucosa, L-Glutamina, sin piruvato sódico); suplementado con los antibióticos Penicilina G-sodio 10 U/ml y Estreptomina-sulfato 10µg/ml, para evitar contaminación bacteriana.
- 10 % SBF

Condiciones de cultivo:

- 37°C / 5 % CO₂.

III.6.1.3. Mantenimiento de la línea celular

El crecimiento de las células en estas condiciones es lento, duplicando su número en 35-48 h. Las células precisan cambios periódicos de medio de cultivo (el crecimiento celular agota los nutrientes y baja el pH del medio).

Una vez se alcanza la confluencia en el cultivo, se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir, resemar en placa o propagar las células.

Para separar las células del sustrato se emplea la tripsina, proteasa sérica de origen pancreático que rompe la matriz extracelular que mantiene adheridas las células a la placa. Su acción es dependiente del tiempo y la concentración, y se inhibe con suero.

Los pases en cultivos primarios nunca sobrepasan 1/5 mientras que en líneas ya establecidas, como en este caso, la media es de 1/10.

III.6.1.3.1. Congelación de la línea celular

Para conservar las células por largos periodos de tiempo, disminuyendo el riesgo de contaminación y evitar la probable pérdida de caracteres por los sucesivos pases, es necesario congelar la línea celular.

1. Eliminar el medio de la placa donde tenemos las células a transfectar adheridas.
2. Lavar la monocapa celular con 5 ml de suero fisiológico. Repetir la operación.
3. Añadir 5 ml de solución de tripsina (0.25% en PBS / PBS 1x: 10 mM tampón fosfato; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) precalentada a 37°C.
4. Incubar a T^aambiente. Monitorizar con la ayuda del microscopio la separación de la monocapa de células de la superficie. Si es necesario, ayudar con pequeños golpes. Procurar que la exposición de las células a la tripsina sea lo menor posible para evitar así el daño celular.
5. Recoger rápidamente la suspensión celular en tripsina y añadirla sobre 5 ml de medio DMEM 10% SBF.
6. Centrifugar a 2500 r.p.m. / 5 min.
7. Decantar el sobrenadante. Resuspender el precipitado manualmente aplicando ligeros golpes antes de añadir el medio, para evitar la agregación celular.
8. Añadir medio de congelación a 4°C (SBF 90%; DMSO 10%) ajustando la concentración celular entre $5-8 \times 10^6$ células/ml. Para conseguir altos niveles de supervivencia se utiliza, por un lado, agentes crioprotectores (DMSO o glicerina) que protegen a las células del daño físico debido a la formación y crecimiento de cristales de hielo así como del daño por variaciones de presión osmótica y, por otro, velocidades de enfriamiento del orden de 1°C / min. desde 37°C hasta -70°C).
9. Alicuotar la suspensión en crioviales.
10. La congelación ha de ser progresiva. Realizar una primera etapa de -20°C / 2h y finalmente congelar a -80°C. Las células almacenadas a -80°C deben ser reactivadas aproximadamente cada 6 meses.

III.6.1.3.2. Descongelación de línea celular

1. Descongelar las células en un baño a 37°C hasta su licuefacción.
2. Aspirar la suspensión celular, transferirla a un tubo de centrifuga y añadir un volumen de medio doble al de la suspensión.
3. Centrifugar a 1200 r.p.m. / 10 min.
4. Desechar el sobrenadante y resuspender las células en medio de cultivo.
5. Contar el número de células y estimar su viabilidad con un hemocitómetro o contador celular (Cámara de Neubauer).
6. Para contar y estimar la viabilidad celular mezclamos 10 µl de suspensión celular y 10 µl de azul Trypan, y cargamos unos 9 µl de la mezcla en la cámara.
7. El método de exclusión del colorante se basa en la captación de ciertos colorantes (Azul trypan ó Eritrosina B) por las células no viables, lo que no sucede con las viables.

$$\text{N}^\circ \text{ células / ml} = N \text{ (media del n}^\circ \text{ de células contadas en los cuatro cuadrados de la cámara) } \times 10^4 \times 2 \text{ (factor de dilución).}$$

$$\text{N}^\circ \text{ de células total} = \text{N}^\circ \text{ células / ml} \times \text{volumen (ml) en el que se han resuspendido las células.}$$

$$\% \text{ células viables} = \text{N}^\circ \text{ células no teñidas} \times 100 / \text{N}^\circ \text{ células total.}$$

8. Una vez conocemos el n° aproximado de células existentes volvemos a sembrar en la placa la cantidad que nos interese y añadimos medio de cultivo hasta alcanzar el volumen deseado.
9. Incubar a 37°C / 5 % CO₂.
10. Cambiar el medio aproximadamente cada dos días. El volumen de medio y el indicador de pH (rojo fenol) que normalmente contiene el medio DMEM, son indicadores de la necesidad de realizar un cambio de medio de cultivo o no.

III.6.2. Transfección transitoria

III.6.2.1. Transfección transitoria mediante lípidos catiónicos

(LyoVec™ / InvivoGen)

Este ha sido el método de transfección utilizado en la mayoría de los experimentos de transfección realizados.

LyoVec™ es un lípido catiónico que pertenece a una nueva familia de fosfolípidos originalmente descritos como reactivos eficientes de transfección tanto *in vitro* como *in vivo* (Floch y cols., 1997). Su carga positiva permite su unión al ADN y su estructura de fosfolípido promueve su fusión con la membrana celular permitiendo la liberación de ADN en el interior celular.

El LyoVec™ es una combinación del fosfolípido DMPTA (cargado positivamente) y el lípido neutro DOPE.

III.6.2.1.1. Sembrado en placa

1. Eliminar el medio de la placa (p100) donde tenemos las células a transfectar adheridas.
2. Lavar la monocapa celular con 5ml de suero fisiológico. Repetir la operación.
3. Añadir 5ml de solución de tripsina (0.25% en PBS / PBS 1x: 10 mM tampón fosfato; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) precalentada a 37°C.
4. Incubar a Tª ambiente. Monitorizar con la ayuda del microscopio la separación de la monocapa de células de la superficie. Si es necesario, ayudar con pequeños golpes. Procurar que la exposición de las células a la tripsina sea lo menor posible para evitar así el daño celular.
5. Recoger rápidamente la suspensión celular en tripsina y añadirla sobre 5ml de medio DMEM 10% SBF (Suero Bovino Fetal).
6. Centrifugar a 2500 r.p.m. / 5 min.
7. Decantar el sobrenadante. Resuspender el precipitado manualmente aplicando ligeros golpes antes de añadir el medio, para evitar la agregación celular.

8. Contar el número de células y estimar su viabilidad con una Cámara de Neubauer (aptdo. III.6.1.3.2 / pto.5)
9. Sembrar aproximadamente 200000 células / pocillo.
10. Añadir 2 ml de medio DMEM 10% SBF.
11. Incubar a 37°C / 5% CO₂ / 24h.

III.6.2.1.2. Transfección

Una confluencia celular próxima al 60% favorecerá el proceso.

Preparación de los complejos LyoVec™ - ADN:

1. Atemperar el LyoVec™ a T^a ambiente (este reactivo se proporciona liofilizado, tras ser reconstituido se almacena a 4°C) y homogeneizar el producto con la ayuda del vortex.
2. Mezclar 1-5 µg de ADN plasmídico con 100 µl de LyoVec™. Agitar con la ayuda del vortex.
3. En caso de ser necesario transfectar más cantidad de ADN plasmídico, aumentar también la cantidad de reactivo manteniendo las proporciones arriba indicadas.
4. Incubar a T^a ambiente /15-30 min. para permitir la formación del complejo.
5. Añadir directamente y de forma homogénea los complejos formados sobre los 2 ml de medio (mantener siempre un ratio de volumen, complejo LyoVec-ADN / Medio de cultivo, de 1:20).
6. Los complejos se pueden almacenar a 4°C ya que permanecen activos para transfectarse al menos durante dos meses.
7. Incubar a 37°C / 5% CO₂ durante 48 h.

III.6.2.2. Transfección transitoria por precipitación de Fosfato Cálcico en células 3T3

El método de transfección transitoria con fosfato cálcico se basa en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos. En esta situación co-precipitan formando unos agregados que son fagocitados / endocitados por las células.

Aparentemente, el agregado con calcio protege al ADN de la degradación por las nucleasas celulares.

Dependiendo del tipo celular, hasta un 10% de las células de una placa fagocitaran el precipitado.

El precipitado se adhiere a la superficie celular y debe ser visible al microscopio al día siguiente de la transfección.

El tamaño y la calidad del precipitado es crítico para el éxito del proceso, que se ve afectado por factores como pequeños cambios de pH de la solución, etc...

III.6.2.2.1. Sembrado en placa

Sembrar aproximadamente 200.000 células / pocillo de una placa p6, tal y como se ha descrito en el apartado III.6.2.1.1.

III.6.2.2.2. Transfección

Una confluencia celular próxima al 60-70% favorecerá el proceso.

1. Añadir 250 µl de mezcla de transfección / pocillo en 1,5 ml DMEM 10%.

MEZCLA para 2 pocillos de una placa de 6 (p6):

X µl DNA.

31.5 µl CaCl₂ 2 M

X µl H₂O (c.s.p. 250 µl)

2. Se añaden gota a gota sobre 250 µl de HBS 2x pH 7.1 en agitación con la ayuda del vortex.

HBS 2x pH 7.1 / 500 ml:	280 mM NaCl
	10 mM KCl
	12 mM Glucosa
	50 mM Hepes, pH 7.05
	0,132 g $\text{HPO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	(Ajustar pH 7.1 con NaOH)

3. Dejar en reposo durante 15 min.
4. Añadir la mezcla uniforme en el pocillo.
5. Incubar a 37°C / 5% CO₂ / 24h.

III.6.2.2.3. Cambio de medio de cultivo

1. Retirar el medio.
2. Lavar con PBS 1x o suero fisiológico / 2 veces.
3. Añadir medio fresco.
4. Incubar a 37°C / 5% CO₂ / 24h.

III.6.2.3. Plásmidos control de los experimentos de transfección

III.6.2.3.1. Vector pGL3-control (*Promega*)

Este vector presenta una secuencia modificada del ADNc del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* (luc⁺) por debajo de las secuencias promotoras y amplificadoras del virus SV40 dando una expresión elevada del gen de la luciferasa en varios tipos celulares.

Este vector es muy útil para determinar la eficiencia de la transfección, utilizándose como control positivo en los ensayos de transfección.

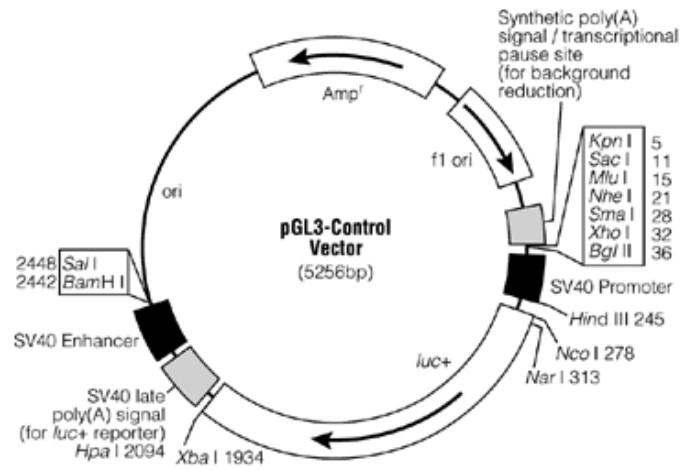


Figura 19. Mapa del vector pGL3-control. Este vector que contiene el gen Rluc detrás del promotor del SV40, se ha utilizado como control positivo en la transfección.

III.6.2.3.2. Vector pRL-CMV (Promega)

Los vectores de la familia pRL tienen la característica de presentar el ADNc de la luciferasa de *Renilla reniformes*. El vector pRL-CMV contiene la región promotora del CMV dando una expresión constitutiva de la luciferasa de Renilla en varios tipos celulares. Este vector ha sido co-transfectado en todos los ensayos para emplearlo como control interno de transfección.

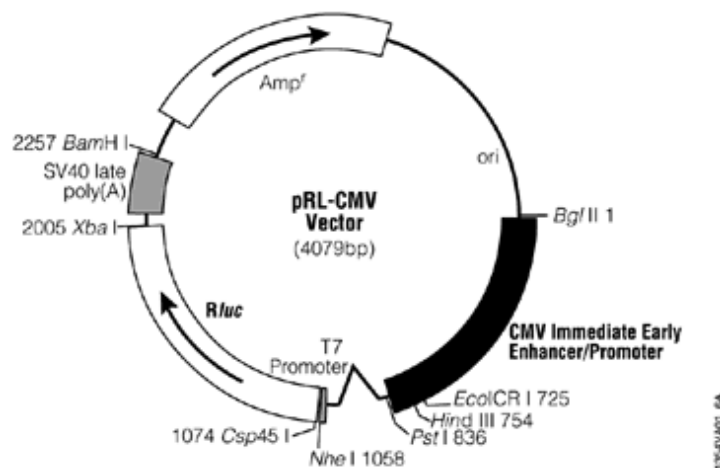


Figura 20. Mapa del vector pRL-CMV. Este vector que contiene el gen Rluc detrás del promotor del CMV, se ha utilizado como control interno de transfección.

III.6.3. Lectura de los resultados de la transfección

III.6.3.1. Ensayos de luciferasa

III.6.3.1.1. Lisado celular

1. Retirar el medio.
2. Lavar dos veces con PBS 1x ó suero fisiológico.
3. Añadir 500 µl de tampón de lisis proporcionado en el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (*Promega*).
4. Incubar en agitación orbital constante, a T^a ambiente / 15 min.

III.6.3.1.2. Detección de la actividad luciferasa de *Photinus pyralis* (P-Luc)

La actividad P-Luc consiste en la oxidación de la luciferina en presencia de Mg²⁺ y ATP, generando la producción de fotones de luz. Esta proteína no requiere modificaciones post-traduccionales, por lo que puede funcionar como indicador de la actividad enzimática inmediatamente después de su traducción.

Se tomaron 20 µl del lisado celular y, en presencia de 100 µl de LAR (“Luciferase Assay Reagent”), se midió la luminiscencia producida durante 15 s. en un luminómetro (SIRIUS Luminometer V3.1 / *Berthold Detection Systems*).

La intensidad de la luz se mantiene constante durante unos 20 s., decayendo lentamente.

III.6.3.1.3. Detección de la actividad luciferasa de *Renilla reniformes* (R-Luc)

La actividad R-Luc se introdujo como control de transfección. Consiste en la oxidación de la coelenterazina, lo que genera la producción de fotones de luz. Esta proteína tampoco requiere modificaciones post-traduccionales, por lo que puede funcionar como indicador de la actividad enzimática inmediatamente después de su traducción. Una vez medida la actividad P-Luc, se añadieron 100 µl de la solución Stop&Glo™. Este reactivo inhibe completamente la actividad P-Luc a la vez que induce la actividad R-Luc. Finalmente se mide la luminiscencia producida durante 15 s. en el mismo luminómetro (SIRIUS Luminometer V3.1).

Tabla IV. Plásmidos recombinantes empleados en los experimentos de expresión génica.

Plásmido	Vector		Inserto				
	Tamaño (pb)	Gen Reporter	Gen Resistencia	Tamaño (pb)	Origen	PCR	Lugar de Inserción
pUC-NRL	pUC-18 (Promega)			NRL			
	2686		Ampicilina	806	ADNc retina (Clontech)	(94°C/1'; 68°C/2'30'')x20 (Expand Long Template / Roche)	EcoRI/Sall (Fermentas)
pCI-NRL	pCI-neo (Promega)			NRL			
	5472		Ampicilina	806	ADNc retina (Clontech)	(94°C/1'; 68°C/2'30'') x20 (Expand Long Template / Roche)	EcoRI/Sall (Fermentas)
pCI-NRL51	pCI-neo (Promega)			NRL51			
	5472		Ampicilina	806	pUC-NRL	(94°C/30''; 55°C/1';68°C/10') x30 (Expand L.T.; Pfu Turbo; DpnI / Roche)	EcoRI/Sall (Fermentas)
pCI-NRL122	pCI-neo (Promega)			NRL122			
	5472		Ampicilina	806	ADNc retina (Clontech)	(94°C/1'; 55°C/1';68°C/2') x30; 68°C/8' (Expand Long Template / Roche) (A=B (DMSO 10x)=A+B)*	EcoRI/Sall (Fermentas)
pCI-CRX	pCI-neo (Promega)			CRX			
	5472		Ampicilina	969	ADNc retina (Clontech)	(94°C/1'; 58°C/1';68°C/2') x35; 68°C/8' (Expand Long Template / Roche)	XhoI/Sall (Fermentas)

* Ver aptdo. III.3.2.4. Material y métodos.

Tabla IV. Plásmidos recombinantes empleados en los experimentos de expresión génica (cont.).

Plásmido	Vector			Inserto			
	Tamaño (pb)	Gen Reporter	Gen Resistencia	Tamaño (pb)	Origen	PCR	Lugar de Inserción
pGL3-130	pGL3-Enhancer (Promega)			RHO (-130/+66)			
	5064	Luciferasa	Ampicilina	250	ADNgenómico	(94°C/30'';58°C/30'';72°C/30'')x40;72°C/10' (EcoTaq Polimerasa / Ecogen)	KpnI/HindIII (Roche)