

OBJECTIUS

OBJECTIUS

En la introducció s'ha exposat que el ronyó murí presenta unes característiques i avantatges especials per ésser utilitzat com a teixit model en l'estudi de l'acció androgènica sobre l'expressió gènica, malgrat tot els factors que determinen l'especificitat d'acció dels andrògens encara ara no estan ben definits.

La funció fisiològica dels andrògens en el ronyó tampoc està clara, degut a que els gens regulats per l'hormona a ronyó són *housekeeping* per proteïnes de funció desconeguda. Tenint en compte aquests antecedents, en el nostre laboratori es va iniciar un projecte d'identificació de nous gens regulats per andrògens al ronyó amb l'objectiu d'establir nous models gènics i obtindre més informació al respecte.

Com ja s'ha esmentat en la introducció un d'aquests gens identificats va ser el gen S_A de ratolí, el cDNA del qual va ser clonat per primer cop en el nostre laboratori; el mRNA de S_A presentava una clara especificitat d'expressió en les cèl·lules epitelials del túbul proximal i una expressió gènica dependent d'andrògens.

La proteïna S_A murina deduïda del cDNA clonat es troba altament conservada entre les proteïnes S_A de rata i humana, encara que es desconeix la seva funció.

Tenint en compte totes aquestes premisses, el propòsit del nostre treball és doble, per una banda identificar i caracteritzar la proteïna S_A murina i per altra banda aprofundir en l'estudi de la regulació gènica del gen S_A .

A tal efecte es plantegen els objectius següents:

1. Continuar l'anàlisi de la regulació de l'expressió del gen S_A murí endogen per les hormones sexuals, especialment en el ronyó i en el fetge i, caracteritzar el patró tissular d'expressió del gen.
2. Clonar i caracteritzar el gen S_A de ratolí juntament amb la seva regió promotora.
3. Analitzar a nivell molecular la regió promotora del gen S_A en assajos d'activitat transcripcional *in vitro* en varies línies cel·lulars.
4. Intentar caracteritzar els trets funcionals de la proteïna S_A murina així com la seva localització cel·lular.
5. Investigar la possibilitat de l'existència d'altres factors responsables de la regulació gènica del gen S_A de ratolí.

MATERIALS

1. ANIMALS I TEIXITS

1.1 Ratolins (*Mus musculus*)

S'han utilitzat ratolins de les següents soques consanguínies:

- C57BL/6
- 129/SvPasIco

Tots els animals s'han adquirit a la casa *IFA CREDO* a l'edat de 6-7 setmanes, estabulant-se a temperatura constant de 22°C en règims de llum-fosc de 12h, alimentats en dieta estàndard (PanLab) i aigua *ad libitum*.

1.2 Procediment quirúrgic

1.2.1 Castració

Els ratolins mascle van ser gonadectomitzats mitjançant extirpació testicular. Els animals van ser anestesiats mitjançant injecció intraperitoneal (0.5mL / 25g de pes) utilitzant la barreja anestèsica formada per *dehidrobenzperidol* (Droperidol® SYNTEX) i *midazolam* (Dormicum® ROCHE) a 1:6 (V/v) en H₂O destil·lada estèril.

Els ratolins són operats a les 7-8 setmanes d'edat després d'un període de quarantena i adaptació a l'estabulari. L'operació en ratolins es porta a terme mitjançant una petita incisió abdominal a través de la qual s'extreu la totalitat de la massa testicular de l'animal; tant la pell com la paret peritoneal es suturen independentment amb varis punts.

Els animals es van deixar recuperar una setmana com a mínim, abans de l'inici de cap tractament o d'altres accions.

Els ratolins femella normals i ovariectomitzades de vuit setmanes d'edat es van obtenir de la casa *IFA CREDO*, es van sotmetre a un període de quarantena i adaptació a l'estabulari abans de realitzar cap manipulació.

1.3 Tractaments

1.3.1 Tractament amb andrògens i amb estrògens

Els tractaments hormonals es van dur a terme durant 6 setmanes mitjançant injeccions diàries de 0.4ml d'una barreja recent preparada que contenia 120µg DHT/0.1mL etanol absolut i 0.3ml d'oli de sèsam per ratolí/dia i, 240µg E₂/0.1ml etanol de la mateixa barreja relació 3:1 amb oli de sèsam. Els animals controls es van tractar amb 0.4mL del vehicle (3:1 oli de sèsam:etanol). Les injeccions s'administraven diàriament per via subcutànea.

1.3.2 Tractament amb els agonistes dels PPAR

Es van tractar ratolins mascles C57BL/6 normals i castrats amb clofibrate –agonista del PPAR α - mitjançant injeccions intraperitoneals diàries durant 5 dies, amb una barreja de

12.5 mg de Clofibrat en 100 µL d'oli d'oliva per ratolí i dia. En tots els cassos es van incloure animals control tractats únicament amb el vehicle, oli d'oliva.

El WY-14,643 (4-Chloro-6-(2.3-xylylidino)-2-pyrinydinylthio-acetic acid, o àcid pirinixic), també és un agonista per PPAR α ; ratolins mascles normals C57BL/6 es van tractar durant 5 dies mitjançant injeccions intraperitoneals a una concentració de 70µg/g diluïts en 20% DMSO i solució salina, es van incloure animals controls tractats solament amb el vehicle, 20%DMSO i solució salina.

El Ciglitzone ((\pm)-5-[4-(-Methylcyclohexylmethoxy)benzyl] thiazolidine-2,4-dione) és un agonista per PPAR γ , ratolins mascles normals C57BL/6 es van tractar durant 5 dies mitjançant injeccions intraperitoneals a una concentració de 20 µg/g diluïts en etanol i solució salina, es van incloure animals controls tractats solament amb el vehicle, etanol i solució salina.

1.3.3 Extracció dels teixits

Un cop finalitzats els tractaments corresponents, es van sacrificar els animals, per dislocació cervical. Immediatament es van recollir els diferents òrgans en condicions lliures de RNAses i es van congelar de cop submergint-los en N₂ líquid. És necessari descapsular els ronyons abans de congelar-los. Els teixits es van emmagatzemar a -80°C.

Tots 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, 25/10/1990*).

2. LÍNIES CEL·LULARS

2.1 Cèl·lules

PKSV-PCT, PKSV-PR

La PKSV-PCT és una línia cel·lular immortalitzada, derivada del túbul proximal renal murí. S'ha obtingut a partir de ratolins transgènics per l'antigen *T-gran* i *t-petit* del virus de simi 40 (SV40) sota el control de la piruvat quinasa. Mitjançant microdissecció de la porció contorta del túbul, d'on es va establir la línia parenteral PKSV-PCT (Cartier *et al* 1993). La PKSV-PR és una línia epitelial immortalitzada derivada com l'anterior del túbul proximal renal murí, però en aquest cas de la part recta del túbul (Cartier *et al* 1993). Obtinguda anàlogament a les cèl·lules PKSV-PCT, són cèl·lules adherents i creixen en monocapes que tenen la capacitat –igual que les PKSV-PCT- de formar *domes*, després de varis dies de post-confluència (Lacave *et al* 1993). La sublínia PCT3, ha estat subclonada per dilució al límit a partir de la línia parenteral PKSV-PCT (Soler *et al* 2002). La sublínia PR10 ha estat subclonada també per dilució límit a partir de la línia parenteral PKSV-PR (Melià *et al* 1998). S'ha demostrat que aquestes línies han retingut les característiques de les cèl·lules parentals de les quals deriven. Així mateix i per primera vegada es va observar l'expressió de receptors d'andrògens i la regulació a l'alça sota tractament amb DHT, de gens indicadors tals com KAP i β -glu (Ouar *et al.* 1998). Aquestes línies han estat amablement cedida pel Dr. Alain Vandewalle.

MDCK

Línia renal canina, derivada originàriament per S. Madin i N.B. Darby l'any 1958 (Madin *et al* 1958) a partir de ronyó normal de gos adult femella. De morfologia epitelial forma, monocapes polaritzades. Han estat cedides pel Dr. Antonio Garcia de Herreros, de l'IMIM.

CV-1

Línia renal normal de primat, derivada a partir de ronyó de mona verda africana mascle adulta (Jersen *et al* 1964). Presenten morfologia epitelial de tipus fibroblast. Han estat obtinguts a 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 transformada amb DNA fragmentat de l'adenovirus humà tipus 5 (Graham *et al* 1977). Presenta morfologia epitelial de tipus fibroblast. Han estat cedides pel Dr. Bruno Stieger de la universitat de Zurich.

HEPG2

Línia cel·lular hepàtica tumoral humana, establerta a partir de teixit cancerós d'un pacient amb carcinoma hepatocel·lular (Aden *et al* 1979). De tipus epitelial, creix formant petits agregats. Han estat cedides pel Dr. Emili Itarte, de la Universitat Autònoma de Barcelona.

2.2 Medis de cultius

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% de CO₂, seguint els procediments i pràctiques estàndard requerides pel treball amb cultius en condicions estèrils.

La fórmula utilitzada en la preparació dels medis de cultiu utilitzats per les diferents línies cel·lulars es presenta a continuació. Tots els procediments necessaris en la preparació han estat realitzats en condicions estèrils.

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	2mM	Biological Industries	03-020-1B
Penicil·lina/ Estreptomicina	100U/mL 200µg/mL	GIBCO-BRL	15240-52

Medi PKSV-PCT3/ PKSV-PR10

Component	Concentració	Proveïdor	Referència
DMEM	50% (v/v)	GIBCO-BRL	01880-028M
Ham's F12	50% (v/v)	GIBCO-BRL	031765-027M
HEPES pH 7.4	20mM	Biological Industries	
Glutamina	2mM	Biological Industries	03-020-1B
D-(+)-Glucosa	12.5mM	SIGMA	G-7021
Transferrina	5µg/mL	SIGMA	T-1438
Insulina	5µg/mL	SIGMA	I-6634
Dexametasona	50nM	SIGMA	D-8893
Triiodotironina	1nM	SIGMA	T-5516
Selenat de sodi	30nM	SIGMA	S-9133
EGF	10ng/mL	SIGMA	E-4127
Sèrum boví fetal	2% (v/v)	Biological Industries	10106-060
Penicil·lina/ Estreptomina	100U/mL 200µg/mL	GIBCO-BRL	15240-52

Medi MDCK, CV-1 i HEK293

Component	Concentració	Proveïdor	Referència
DMEM high glucosa	1:1	Biological Industries	01-055-1A
Piruvat Sòdic	1% (v/v)	Biological Industries	03-042-1
Aminoàcids no essencials	1% (v/v)	Biological Industries	01-340-1B
Sèrum boví fetal	10% (v/v)	Biological Industries	10106-060
Penicil·lina/ Estreptomina	100U/mL 200µg/mL	GIBCO-BRL	15240-52
Glutamina	2mM	Biological Industries	03-020-1B

3. SOQUES BACTERIANES

3.1 JM109: *recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(r_{k-}, r_{k+}) relA1 supE44Δ(lac-proAB) [F⁻ traD36 proAB lacI^qZΔM15]* (Yanisch-Perron 1985). Aquesta soca, deficient en recombinases, s'utilitza pel creixement i la clonació de plasmidis, presenta una elevada eficiència de transformació i permet realitzar l'*screening* blau/blanc en presència d'IPTG i de X-gal.

3.2 Epicurian Coli[®]XL1-Blue Competent Cells: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F⁺ proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*. Aquesta soca pertany a la casa comercial Stratagene, permet el creixement i la clonació de plasmidis i presenta una elevada eficiència de transformació.

3.3 XL1-Blue MRA (P2): XL1-Blue MRA lisògena pel fag P2; $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac$ (STRATAGENE *Product Catalog*, 1998). Aquesta soca s'utilitza com a hoste per l'amplificació i la propagació dels fags λ recombinats.

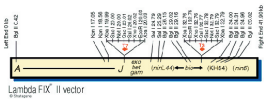
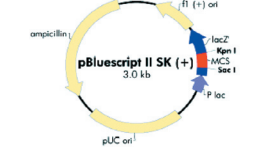

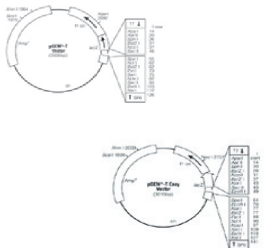
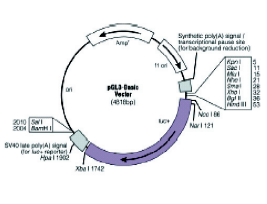
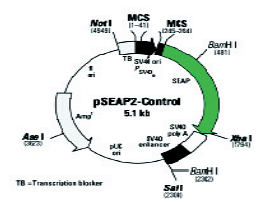
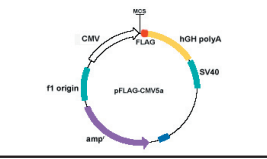
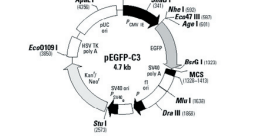
3.4 DH5- α : F *endA1 recA1 hsdR17 (r_{k-}, m_{k+}) deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 λ* .

3.5 TOP10: F⁻ *mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ Φ 80 LacZ Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*. Soca comercial optimitzada pel clonatge de tot tipus de plasmidis. Presenta una elevadíssima eficiència de transformació. Permet fer la selecció blau/blanc sense haver d'afegir l'IPTG.

4. VECTORS

Els vectors més rellevants utilitzats en la realització d'aquest treball experimental es presenten en la taula 9, es tracten tant de vectors plasmídics com fagèmids. Els vectors que codifiquen per als PPAR (PPAR α , PPAR γ i PPAR δ/β) han estat cedits pels Dr. Diego Haro i Dr. Pedro Marrero de la unitat de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Els vectors que codifiquen per al receptor d'andrògens murí (mAR), el SREBP1c i el RXR han estat cedits per la Dra Dianne Robbins de la Universitat de Ann Harbor (Michigan USA), el Dr. Francesc Villarroya del departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona i el Dr. Alberto Muñoz del Instituto de Investigaciones Biológicas Alberto Sols, CSIC, de la Universidad Autónoma de Madrid, respectivament.

Taula 9. Característiques d'alguns dels vectors utilitzats en aquest treball

Nom	Característiques	Mapa
Lambda [®] FIX II	Vector lambda per DNA genòmic que permet inserts de 9 a 23 Kb clonats en la diana de restricció XhoI. L'escició és amb NotI. Aquest vector pertany a la casa comercial Stratagene.	
pBLuescriptII	Vector multicòpia de clonació per propòsits generals de clonació. Disposa d'un polylinker amb nombroses dianes de restricció disponibles, selecció blau/blanc dels recombinants i resistència a ampicil·lina.	
pCR2.1-TOPO	Vector plasmídic de la casa comercial Invitrogen preparat pel clonatge de productes de PCR basat en el mètode "TA". Vector linealitzat amb els extrems activats amb la unió covalent de l'enzim Topisomerasa I, que afavoreix la unió del DNA a clonar.	
pGEM-T i pGEM-TE	Plasmidi recombinant que permet el clonatge directe de productes de PCR, ja que conté uns extrems timidina protuberants que poden complementar amb els del producte d'amplificació. Selecció per ampicil·lina i b-gal. Es diferencien amb l'absència (pGEM-T) o presència (pGEM-TE) d'una diana EcoRI flanquejant l'insert que facilita l'alliberament per digestió.	
pGL3-basic	Plasmidi reporter per a l'anàlisi de seqüències promotores i reguladores. Permet la clonació del fragment de DNA d'interès fusionat amb la seqüència codificant del gen luciferasa, l'activitat de la qual ens servirà per determinar la capacitat d'activació transcripcional del fragment de promotor clonat, en assajos de transfecció transitoria.	
pSEAP-control	Plasmidi d'expressió en cèl·lules eucariotes de l'enzim reporter fosfata alcalina secretada (SEAP) sota el control del promotor víric (SV40), utilitzant com a control de la transcripció. La presència del early promoter i l'enhancer del SV40 asseguren uns nivells d'expressió elevat en la majoria de línies cel·lulars.	
pFLAG-CMVa	Plasmidi derivat del pCMV5, vector d'expressió de proteïnes de fusió amb un marcador octapèptid (FLAG) en posició C-terminal i en cèl·lules de mamífer. Està sota control del promotor del citomegalovirus humà (CMV).	
pEGFP-C3	Vector d'expressió en cèl·lules de mamífers de proteïnes de fusió amb la proteïna GFP (Green Fluorescence Protein) en posició N-terminal. La presència del SV40 asseguren uns nivells d'expressió elevat en la majoria de línies cel·lulars.	

5. REACTIUS QUÍMICS

Els productes químics utilitzats provenen principalment de les cases BOEHRINGER-MANHEIM-ROCHE, FLUKA, MERCK, PANREAC i SIGMA-ALDRICH entre d'altres. L'obtenció dels isòtops radiactius, majoritàriament nucleòtids com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$, $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$, com alguns altres compostos marcats amb ^{14}C i ^{35}S , han estat subministrat per les cases AMERSHAM-BIOSCIENCES, AMERICAN RADIOLABELED i ICN.

6. OLIGONUCLEÒTIDS

El disseny dels oligonucleòtids s'ha portat a terme intentant escollir les parelles de primers que oferissin unes llargàries i T_m semblants, per tal d'obtenir unes condicions d'amplificació òptimes. La majoria s'han dissenyat utilitzant el programa *Oligo*[®] 4.02 primer analysis software. Els proveïdors encarregats de la seva síntesi ha estat la casa BOEHRINGER-MANHEIM.

A continuació es detallen les característiques dels principals primers utilitzats en aquest treball. No s'hi ha inclòs els primers d'anclatge als vectors ni els estàndards com T7 i T3.

Taula 10. Oligonucleòtids utilitzats en la realització d'aquest treball

Nom	Seqüència 5'-3'	T_m (°C)	Orientació	Comentaris
SA-FLAGu	gtcgacATGTTACTCCGTGC	58	forward	Clonatge en pFLAG.CMV.5a Diana Sal I
SA-FLAGL	gtcgacAGTTGTTACCGATT	58	reverse	
SEQSA1u	ATGTTACTCCGTGCTAGGTG	52.5	forward	Seqüenciació del cDNA de SA
SEQGAL2u	GAGGAGACAGAGTAATGGTG	57.3	forward	
SEQGAL4u	TTTGCACACTATTTGCCCCG	57.3	forward	
SEQSA2L	GGCAGATTACAGGAGCATTG	56.7	reverse	
SEQSA3L	GGTCCAATTCGGTAACCAG	56.7	reverse	
SEQSA4L	AACAAGCATCCGGTAGGCAG	59.4	reverse	
SEQSA5L	GAGGATGTCTTTCTGGGTC	56.7	reverse	
SEQSA7L	GGTCGCAGACAGGCCACATT	64	reverse	
SEQSA8u	AGTGCATTATTACCGAT	55	forward	
SEQSA9u	GCCAACATACTCACAG	49.2	forward	
SEQSA10u	GAAGGTCAAAGTATAAGAGA	54	forward	
SEQSA13u	ATATGCCAGTGACAGCCACA	57.3	forward	
SEQSA16u	GAGCAGCTATAAGTTCAACA	56	forward	
SEQSA17L	CCTGTCTGTCTTTGCCACGA	60	reverse	
SEQSA21L	GTGCTCTGAGGCAGGTGAAA	57.8	reverse	
HRSAu3	ACTACCCAGTGTTCATCC	56.8	forward	Per Radiation Hybrid mapping
HRSAL4	CTCTTATTGGGAGCATGGGA	55.3	reverse	
E1'	GATCCACCACCAACTAAA	58	forward	5'-RACE. RT-PCR i Primer Extension
E1	CATCTATCACTCCAGCTGTG	60	forward	
E2	GTGCATAATCTTTAGGTCCC	58	reverse	
E3	GGCTAGGCATCATGCTGATG	57	reverse	
E4	TGAAAACACCTAGCACGGAG	57.3	reverse	
race1SAu	GCTGTGTGGGAAGCAGTATC	54.7	forward	
GSA2L	CCAGCTTGAACCTCCTTGTC	56.5	reverse	

GSA1U	CCACCAACACTAAAGCAGAG	53.3	<i>forward</i>	Obtenció de la mida dels INTRONS del gen S _A
GSA3U	GCATGATGCCTAGCCACCAG	59.9	<i>forward</i>	
GSA4L	GGCATGTGAGATTTCCATGC	56.3	<i>reverse</i>	
GSA5L	TAGGATCAGGAATTGCTAGG	50.2	<i>reverse</i>	
GSA6U	AAAGATGTCCTGGACCAATG	53.4	<i>forward</i>	
GSA7L	AGGCTGGATTGGAAAGTCTC	54.6	<i>reverse</i>	
GSA8U	CAAATGTGGCCTGTCTGCGA	61.4	<i>forward</i>	
GSA9L	TCCTGGAATTAACCTGTCC	50.4	<i>reverse</i>	
GSA10U	GGAACCTCAAGGAGATGATG	52.3	<i>forward</i>	
GSA11L	ACAAGTGTGGCTGTCACTGG	57.2	<i>reverse</i>	
GSA12U	GCTTTGGTTTAGGATTGTCT	50.6	<i>forward</i>	
GSA13L	ACATCACATCGGAGGCTATC	52.8	<i>reverse</i>	
GSA14U	CTACCGATGCTTGTTTCAGA	50.8	<i>forward</i>	
GSA15L	GTTCTCCAGCACTGACACAG	53.6	<i>reverse</i>	
GSA16U	CTATGAAGGATATGGACAGA	50	<i>forward</i>	
GSA17L	GCCGGGCTTAATTTTCATCC	58.6	<i>reverse</i>	
GSA19L	TTGTCCAGGAGGAAGAGTGG	56.4	<i>reverse</i>	
GSA20U	CTGAGCGACCATTGGCCTT	61.2	<i>forward</i>	
GSA21U	TGTTGTCAGCAGTCCAGACC	56.2	<i>forward</i>	
GSA22L	TCATGGGACTTGTAATCAGG	51.3	<i>reverse</i>	
INSA1L	TCCATTGCCTGTTGAGTCAG	55.5	<i>reverse</i>	
SEQSAi19L	GAAGTGGAGAGTAGCTGTACC	46.1	<i>reverse</i>	
SEQSAi20U	GCAGTGGCTACAGAGATTT	52.2	<i>forward</i>	
PROM1Kbu	agatctGTGTGACTATTTACATAGTA	48	<i>forward</i>	Amplificació dels diferents fragments de promotor del gen S _A , clonatge en pGL3. Dianses Bgl II i Hind III
PROM1Kbl	agatctTGGTGGATCAAAGTGGACGG	65	<i>reverse</i>	
-904ProU	agatctGCTTGCTTGTGTGACAGGCT	65	<i>forward</i>	
-747ProU	agatctCCAGTTATTTAAGTTGGAATTTGA	58.6	<i>forward</i>	
-639ProU	agatctGTTACTAGTTAATATCTACACTG	49.3	<i>forward</i>	
-496ProU	agatctGGTTGGGAAGAAAGGCCTGG	67.4	<i>forward</i>	
-331ProU	agatctGGTCTGGGTCAGAGAAGACA	61.1	<i>forward</i>	
-210ProU	agatctGCTTTTCAGCAAGCCTTTCC	64.3	<i>forward</i>	
-110ProU	agatctGGTTAAGTAAGACAGGCCAG	59.1	<i>forward</i>	
-72ProU	agatctGCTCCTCCCACCAATATATC	59.1	<i>forward</i>	
Prom2Kbu	aagcttGTGAAAAGAGAGCAGTGTAAGT	63	<i>forward</i>	
Prom2Kbl	aagcttTGGTGGATCAAAGTGGACGG	67.2	<i>reverse</i>	
GFP-SA _U	gaattcTATGTTACTCCGTGC	56	<i>forward</i>	Clonatge en pEGFP-C3 Diana EcoRI
GFP-SA _L	gaattcAATTAGTGGGAGGAG	56	<i>reverse</i>	
G454Aup	GTTTCTACATTACTGCGGACAGAGGATATATG		<i>forward</i>	Mutagènesi de la proteïna S _A
G454A _{low}	CATATATCCTCTGTCCGAGTAATGTAGAAAC		<i>reverse</i>	
D455Aup	GTTTCTACATTACTGGGGCCAGAGGATATATG		<i>forward</i>	
D455A _{low}	CATATATCCTCTGGCCCCAGTAATGTAGAAAC		<i>reverse</i>	
G463Aup	GGATGAAGATGCCTATTTCTGGTTTGTG		<i>forward</i>	
G463A _{low}	CAACAAACCAGAAATAGGCATCTTCATCC		<i>reverse</i>	

R470Aup	CTGGTTTGTTCAGCATCAGATGATATC		<i>forward</i>	Mutagènesi de la proteïna S _A
R470Alow	GATATCATCTGATGCTGCAACAAACCAG		<i>reverse</i>	
G479Aup	CATATTATCTTCTGCTTACCGAATTGGAC		<i>forward</i>	
G479Alow	GTCCAATTCGGTAAGCAGAAGATAATATG		<i>reverse</i>	
E488Aup	CATTTGAGGTAGCAAGTGCCCTCATAG		<i>forward</i>	
E488Alow	CTATGAGGGCACTTGCTACCTCAAATG		<i>reverse</i>	

7. INSTRUMENTACIÓ I APARELLS

Taula annex amb els noms i models dels principals aparells utilitzats.

Aparells	Model	Fabricant
Autoclau		MATACHANA
Màquina de gel	AF20	SCOTMAN
Grans centrífugues	RT600D	SORVALL
	RC5C	SORVALL
Reveladora	CURIX60	AGFA
Seqüenciador automàtic	PERKIN ELMER	ABI PRISM 310 <i>Molecular analyzer</i>
Ultracongeladors (-80°C)		REVCO
Nevera/congeladors (-20°C)		LIEBHER
Campanes de Fluxe	BIO II A	TELSTAR
	BIO IIB	
	AV-30/70	
Incubador de CO ₂	SCIENTIFIC	FORMA
Contenedor de N ₂	BR2100 CRYO DIFFUSION	LERY-FRANCE
Font d'aigua destil·lada	MILLI-RO®	MILLIPORE
Font d'aigua bidestil·lada	MILLI-Q _{plus}	
Speed-Vac	SC100	SAVANT
Assecador de gels	SLAB GEL DRYER SGD 4050	
Centrifuga refrigerada	5415R	EPPENDORF
Microfugues	MICROFUGUE E™	BECKMAN
	112	SIGMA
	EBA12	HETTICH
Cubetes d'electroforesi	(diferents tamanys)	ECOGEN
	MINI SUB-CELL® CELL GT	BIO-RAD
	SUB-CELL® CELL GT	BIO-RAD
	MINIPROTEAN II	BIO-RAD
	MINIPROTEAN III	BIO-RAD
	PROTEAN® II xi CELL	BIO-RAD
Fonts d'electroforesi	LKB-GPS 200/400	PHARMACIA
	EPS 500/400	PHARMACIA
	POWER PAC300	BIO-RAD
	E741	CONSORT

Estufes		MEMERT
		HERAEUS (37°C)
Banyes d'aigua termostatitzats		Thermomix MMB. BRAUN
	ADOLF KÜHNER AG	AQUA SHAKER
Plaques calefactores/ Agitadors magnètics	TERMOBLOCK	P SELECTA
	NUOVA II STIR PLATE	THERMOLINE
	MR2002	HEIDOLF
Forns d'hibridació		HYBAID
		ECOGEN
Shaker (agitador)		ADOLF KÜHNER AG
Agitador orbital	CM100	LUCKHAM
Vòrtex	REAX 2000	HEIDOLPH
Microscopi òptic	BX40	OLYMPUS
Microscopi invertit		LEICA
Microscopi confocal	DMIRB	LEICA
Espectofotòmetres		UBIKON
	GENE QUANT II	PHARMACIA
Luminòmetre de plaques	LUMINOSCAN RS	LABSYSTEM
Termocicladors	PTC-100	MJ RESEARCH INC.
	<i>Geneamp PCR system 2400</i>	PERKIN ELMER
	<i>Geneamp PCR system 9600</i>	PERKIN ELMER
Homogenitzador	POLITRON® KINEMATICA AG	LITTAU-LUZERN SWISS

MÈTODES

1. PURIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

1.1 Extracció de RNA total

L'extracció de RNA s'ha realitzat bàsicament amb el mètode descrit per Chomczynski i Sacchi (1987) amb algunes modificacions. Immediatament després de sacrificar l'animal s'extreuen els teixits en condicions lliures de ribonucleases i ràpidament es congelen en nitrogen líquid. Es guarda a -80°C . Les quantitats estan ajustades per processar peces de teixit de 200-300mg –que correspon aproximadament al pes d'un ronyó de ratolí adult- dels quals s'obté entre 400 i 700 μg de RNA total segons el teixit. Per homogenitzar els teixits s'ha utilitzat un homogenitzador *Politron*.

Reactius:

Solució D	Acetat sòdic 2M pH4.0
Fenol-H ₂ O (DEPC)	Alcohol isopropílic
Cloroform/alcohol isoamílic 49:1 (v/v)	Etanol 70%

Procediment:

1. Homogenitzar cada mostra (200-300 mg) en 4 mL de solució D
 2. Passar l'homogenat a un tub Corex® de vidre lliure de ribonucleases i afegir respectant l'ordre:
400 μL d'acetat sòdic 2M pH 4.0.
Barrejar per inversió
4mL de Fenol-H₂O (DEPC).
Barrejar per inversió
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 a 4°C
 5. Recuperar la fase aquosa.
 6. Afegir 5.5 mL d'isopropanol 100% fred (-20°C) o agitar amb força
 7. Incubar-ho a -20°C durant un mínim de 2h
 8. Centrifugar 20 min a 10.000 rpm a 4°C
 9. Decantar el sobrenedant d'immediat i resuspendre en 700 μL de solució D
 10. Afegir 700 μL d'alcohol isopropílic 100% fred i agitar amb força
 11. Incubar a -20°C com a mínim 60 min
 12. Microfugar 15 min a 13.000 rpm a 4°C
 13. Decantar el sobrenedant i rentar el *pellet* amb etanol 70% fred
 14. Microfugar 15 min a 13.000 rpm a 4°C
 15. Decantar el sobrenedant i assecar el *pellet*
 16. Resuspendre en H₂O lliure de ribonucleases (entre 100 i 200 μL) i valorar la concentració a l'espectrofotòmetre (260nm)
- Un cop obtingut, el RNA s'emmagatzema a -80°C .

Extracció de RNA total amb el kit *RNeasy* de QIAGEN

El kit es basa en la utilització de columnes cromatogràfiques d'afinitat. Essencialment s'ha seguit les recomanacions del fabricant. La qualitat i puresa del RNA obtingut és suficient per utilitzar-lo en aplicacions com *Northern-blot* o RT-PCR.

1.2 Purificació de DNA plasmídic

1.2.1 Mini-preparació de DNA plasmídic (*miniprep*)

S'ha utilitzat el *kit* comercial *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* de PROMEGA. Es parteix de 3-5 mL de cultiu bacterià d'E.coli, les cèl·lules es sotmeten a lisi alcalina i el DNA és adsorvit a una resina especial, seguint les instruccions del fabricant. Els rendiments obtinguts es troben entre 15-25 µg de DNA. Amb aquest kit s'aconsegueix DNA plasmídic amb la puresa suficient com per ser utilitzat en seqüenciació automàtica o per la seva posterior digestió amb enzims de restricció.

1.2.2 Maxi-preparació de DNA plasmídic (*maxiprep*)

En aquest cas s'han utilitzat dos kits comercials diferents:

- Plasmid Maxi kit[®] de QIAGEN
- Nucleobond[®] AX500 de MACHERY-NAGEL

Es parteix de volums de cultiu bacterià de 400-500 mL els rendiments obtinguts oscil·lent entre els 0.8 mg-2 mg; seguint les instruccions del fabricant.

1.3 Purificació del DNA del bacteriòfag λ

1.3.1 Mini-preparació de DNA del bacteriòfag λ (*lambda-miniprep*)

S'ha utilitzat el *kit* comercial *Wizard[®] Lambda Preps DNA Purification System* de PROMEGA. La purificació del lambda-DNA es duu a terme a partir de lisats de cultius líquids o lisats en placa, s'han seguit les instruccions descrites pel fabricant, obtenint uns rendiments de 6-10 µg de DNA a partir de 10 mL de lisat.

1.3.2 Maxi-preparació de DNA del bacteriòfag λ (*lambda-maxiprep*)

En aquest cas s'ha emprat el *kit* comercial *Lambda Maxi Kit* de QIAGEN. Els lisats de fags s'han realitzat en placa, a partir de la infecció de 20 plaques de 10 cm, obtenint de 100-150 mL de lisat d'elevat títol (1×10^7 - 1×10^8 pfu/mL), obtenint rendiments de fins a 15-200 µg de DNA bacteriòfag.

Reactius:

- Plaques NZY-*bottom*
- Top Agar
- Maltosa al 20% (w/v)
- MgSO₄ 100mM
- Medi LB
- Tampó SM
- Cloroform
- *Lambda Maxi kit* de QIAGEN

Procediment:

Preparació de les cèl·lules HOST, propagació i preparació de lisats en placa:

1. Cultiu d'*E.coli 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 MgSO₄ 100mM). 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 recombinant (amb 1x10⁵-1x10⁶ pfu totals, 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 placa
5. Quan el “top-agar” s’hagi endurit suficientment de 5-10 min, invertir les plaques i incubar-les a 37°C durant 6-12 h o fins que s’hagi produït una lisi completa o confluent.

Elució dels fags

1. Un cop les plaques estan lisades, recuperar els fags afegint-hi 3-4 mL de tampó SM/placa de 90 mm
2. Mantenir-les amb agitació constant durant 3-4 h a temperatura ambient per tal d’eluir-ne els fags
3. Recollir els eluïts de les plaques, esbandir-les amb un 1 mL tampó SM i ajuntar-ho amb la resta del volum de lisat. Afegir-hi cloroform (2% v/v), barrejar vigorosament.
4. 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

S’ha utilitzat el kit *Lambda Maxi kit* de QIAGEN, i bàsicament seguint les instruccions presentades pel fabricant. Normalment es parteix de 100-150 mL de lisat a partir de 20 plaques de bacteri infectades amb el fag.

1.4 Extracció de DNA genòmic

El DNA genòmic s’ha obtingut a partir de ronyó de ratolí utilitzant un protocol estàndard, basat en la digestió del teixit amb proteïnasa K i extracció fenòlica. S’inicia a partir de teixit fresc o congelat encara que amb aquest últim s’aconsegueix una pitjor qualitat de DNA genòmic. El rendiment és aproximadament de 50-200 µg de DNA per 100 mg de teixit.

Reactius:

- Solució de digestió (SDS 05%, EDTA 100 mM, Tris-Cl 50 mM, pH 8.0)
- Proteïnasa K a 10 mg/mL
- Ribonucleasa A a 10 µg/mL
- Fenol-Tris pH 8,0

- Fenol/Cloroform 1:1 (v/v)
- Cloroform/alcohol isoamílic 24:1 v/v
- Acetat sòdic 3M, pH 6,0
- Alcohol etílic
- Tampó TE (EDTA 1mM, Tris-Cl 10 mM, pH 8,0)

Procediment:

1. Tallar la mostra de ronyó en trocets i ficar-los en un tub eppendorf estèril. Afegir-hi 700 µL de solució de digestió.
2. Afegir 35 µL de proteïnasa K a 10 mg/mL.
3. Incubar la mostra a 55°C *o/n* amb agitació orbital.
4. Afegir 20 µL de RNasa A a 10 µg/mL i incubar-la 1h a 37°C.
5. Centrifugar breument per sedimentar els restes de teixit no digerit, transferir el sobrenadant a un nou tub (aquest és molt viscos i s'ha de fer amb una punta retallada).
6. Afegir 700 µL de fenol-Tris pH 8,0 i barrejar per inversió 5 min.
7. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm per separar les dos fases.
8. Transferir la fase aquosa a un nou tub.
9. Afegir 700 µL de fenol/cloroform 1:1 (v/v) i agitar per inversió 5 min a temperatura ambient; repetir el pas 7.
10. Transferir la fase aquosa a un nou tub.
11. Afegir 700 µL de cloroform/alcohol isoamílic 24:1 (v/v) i barrejar per inversió 5 min.
12. Repetir el pas 7; recupar la fase aquosa i passar-la a un nou tub.
13. Afegir 70 µL d'acetat sòdic 3M, pH 6.0; remenar.
14. Afegir al tub 700 µL d'alcohol etílic a temperatura ambient, per tal de precipitar el DNA genòmic.
15. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm i descartar el sobrenadant.
16. Rentar el *pellet* amb 1 mL d'etanol al 70%.
17. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm i descartar el sobrenadant.
18. Repetir els passos 16 i 17.
19. Deixar assecar breument el DNA genòmic.
20. Resuspendre el *pellet* en 100 µL de TE, deixant resuspenent tota la nit a 4°C amb agitació suau. Es conserva a 4°C.

1.5 Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa

Els fragments de DNA que han estat resolts per electroforesi en un gel d'agarosa poden ser recuperats per ser utilitzats en aplicacions posteriors.

Primerament, es retalla la banda o bandes d'interés sota il·luminació ultravioleta per poder visualitzar el DNA. La peça d'agarosa es diposita dins un tub eppendorf prèviament tarat i es pesa en balança. Per purificar el DNA 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. S'ha seguit bàsicament el protocol suggerit pel fabricant.

1.6 Purificació dels productes de PCR o RT-PCR

Els DNAs amplificats mitjançant una reacció de PCR o RT-PCR s'han separat dels primers, nucleòtids i altres components utilitzats en la PCR, emprant el *kit* comercial *High Pure™ PCR product purification kit* de ROCHE. Es basa en l'ús de columnetes –adaptades a una microfuga– amb un polímer que reté el DNA. Amb aquest sistema es pot purificar fragments amplificats de DNA entre 0.1-10 Kb de llargada. S'han seguit les indicacions del fabricant, eluïnt finalment el DNA en un volum de 30-50 µL de tampó Tris-Cl 10mM, pH 8.0, o H₂O destil·lada estèril per tal d'obtenir la major concentració possible.

2. ANÀLISI D'ÀCIDS NUCLEICS

L'anàlisi electroforètic ens ha permès visualitzar les mostres d'àcids nucleics resultants de digestions de DNA plasmídic, productes de PCR, etc. Segons el grau de separació i tamany del DNA a analitzar així com el nombre de mostres, s'han utilitzat cubetes per gels petits o mitjants amb percentatges d'agarosa entre 0.7-2% (w/v) preparats en tampó TAE 1x. El bromur d'etidi –ens permet visualitzar el DNA al trans-il·luminador– s'incorpora directament en el gel a una concentració final de 0.5 µg/mL.

En el cas de l'anàlisi de RNA s'han realitzat gels d'agarosa-formaldehid utilitzant agarosa de la màxima puresa (*Molecular biology grade agarose*, PROMEGA) i emprant una cubeta mitjana reservada exclusivament per treballar amb RNA lliure de RNases.

En tots els casos les mostres a carregar s'han diluït en 1/10 en tampó de càrrega (Tampó de càrrega 10X: 50% Glicerol, 0.2% Blau de bromofenol, 0.21% Xylene cyanol FF i 0.2M EDTA pH 8.0).

2.1 Marcatge radioactiu de sondes de DNA

Els fragments de DNA marcats radioactivament s'han utilitzat com a sondes en diferents tècniques com el *Southern-blot*, el *Northern-blot* i en l'*screening* de les genoteques, totes elles basades en l'hibridació entre àcids nucleics de cadena complementària.

S'han utilitzat principalment sondes de DNA de cadena doble –superiors a 100 pb de llargària– i oligonucleòtids curts de cadena sencilla.

2.1.1 Marcatge d'oligonucleòtids en 5'

La llargària de l'oligonucleòtid és entre 15-25 nt i s'ha utilitzat l'enzim polinucleòtid quinasa, que catalitza la transferència d'un grup fosfat desde la molècula d'ATP a l'hidroxil lliure de l'extrem 5' de l'oligo, incorporant-hi l'àtom radioactiu de ³²P de l'ATP.

Reactius:

1. Polinucleòtid quinasa (PNK) del fag T₄ [PROMEGA]
2. Microcolumnes ProbeQuant™ G-25 [AMERSHAM-PHARMACIA]
3. [γ³²P]ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/mL) [AMERSHAM-PHARMACIA]

Procediment:

1. En un tub eppendorf, preparar la següent reacció de marcatge:

H ₂ O miliQ	2µL
10x Kinase buffer	1µL

Oligonucleòtid a 10 μ M (1pmol total)	1 μ L
T ₄ PNK a 10 U/ μ L	1 μ L
[γ ³² P]ATP	5 μ L
V _{final}	10 μ L

2. Incubar a 37°C durant 30 min.
3. Purificar la reacció utilitzant les microcolumnes G-25, seguint les instruccions del fabricant.
4. Determinar amb el contador de centelleig les *dpm* i calcular l'activitat específica incorporada a la sonda.
5. Reservar a 4°C fins a la seva utilització.

2.1.2 Marcatge de sondes per *Random priming*

S'ha utilitzat el *kit* de marcatge *Random Priming DNA labeling kit*, de la casa comercial BIOLOGICAL-INDUSTRIES, que conté una única barreja de marcatge preparada en el tampó adequat per ser utilitzada. El fragment *Klenow* de l'enzim DNA polimerasa inicia la síntesi de DNA des de múltiples punts hibridant de manera inespecífica *primers* de seqüència aleatòria; obtenint-se activitats específiques de marcatge molt altes.

Utilitzem com a motllo 25 ng de DNA de doble cadena purificat seguint les instruccions del fabricant.

Reactius:

1. *Random Priming DNA labeling kit* [BIOLOGICAL-INDUSTRIES]
2. [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) [AMERSHAM-PHARMACIA]
3. Microcolumnes *Microspin G-50* [AMERSHAM-PHARMACIA]

Procediment:

1. Desnaturalitzar el DNA motlle 5' a 100°C. 25 ng en un V_{final} de 11 μ L d'H₂O destil·lada estèril.
2. Montar la reacció de marcatge:

11 μ L DNA diluït
5 μ L [α - ³² P]dCTP
4 μ L Labeling mix
3. Incubar a 37°C, 30 min.
4. Purificar la reacció utilitzant les columnes G-50, segons fabricant.
5. Determinar l'activitat de la sonda al comptador de centelleig.
6. Reservar la sonda a 4°C fins a la seva utilització.

2.2 Anàlisi de DNA

2.2.1 Southern-blot

La tècnica d'hibridació o southern blot anomenada així en honor a qui la va desenvolupar al 1975, s'utilitza per identificar i localitzar fragments específics de DNA en una barreja complexa. Els fragments de DNA poden ser genòmics o plasmídics provinents d'una digestió amb enzims de restricció o també productes de PCR o RT-PCR, aquests són separats pel seu tamany per electroforesi en un gel d'agarosa i després es transfereixen per capil·laritat en gradient salí a una membrana de nylon o nitrocel·lulosa. Per la detecció del fragment

d'interés en la membrana, utilitzem un altre fragment de DNA que s'anomena sonda i que conté la seqüència complementària al fragment que volem identificar. La sonda, es marca amb un isòtop radiactiu i s'incuba amb la membrana. Les membranes que s'han utilitzat han estat de nylon (*ZetaProbe*, BIORAD), que ofereixen una millor sensibilitat i menor *background*.

Les condicions d'hibridació han estat les suggerides pel proveïdor de les membranes de nylon.

Procediment:

Digestió 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 fins que els fragments s'hagin separat adequadament.

Transferència

3. Depurinació: Transferir el gel a una safata que contingui una solució de HCl 0.25M. Agitar suaument durant 10min. Esbandir el gel breument en H₂O destil·lada.
4. Desnaturalització: submergir el gel en tampó desnaturalitzant NaOH 0.5M/NaCl 1M, durant 20 min amb agitació suau. Rentar el gel amb H₂O destil·lada.
5. Neutralització: submergir el gel en Tris-HCl 0.5M, pH 7.4/ NaCl 3M i deixar-ho equilibrar durant 30 min amb agitació suau.
6. Realitzar el montatge de la transferència.
7. Es deixa transferint 12-16h.
8. Desmontar la transferència, deixar assecar la membrana i, fixar el DNA amb radiació UV (mitjançant un aparell crosslinker [STRATAGENE]).
9. Guardar la membrana seca entre dos papers whatman 3MM fins la seva utilització.

Protocol d'Hibridació

10. Ficar la membrana en un tub d'hibridació que conté un volum de solució de pre-hibridació (20 mL si és un tub gran, 10 mL si és petit). Solució de pre-hibridació/hibridació:

SDS	7%
Na ₂ HPO ₄ , pH7.4	0.12M
NaCl	0.25M
Formamida	50%
11. Pre-hibridar a 42°C un mínim de 5 min.
12. Desnaturalitzar la sonda marcada 5 min a 100°C i afegir-la al tub d'hibridació. S'utilitzen 1-2x10⁶ cpm/mL.
13. Hibridació *o/n* a 42°C.
14. Rentar la membrana seguint els passos següents:
 - Quatre rentes de 5 min amb 2X SSC / 0.1% SDS (RT)
 - 1 rentat de 15 min amb 0.5X SSC / 0.1% SDS (RT)
 - 1 rentat d'1 h amb 0.1X SSC / 0.1% SDS (50°C)
15. Exposar la membrana hibridada a un film d'autoradiografia (Hyperfilm, Amersham-Pharmacia o X-OMAT KODAK) en cassettes de raigs-X, a -70°C

2.2.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Tècnica bàsica àmpliament utilitzada en aquesta tesi que ens permet amplificar DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa. A part d'obtenir grans quantitats de DNA a partir d'un àcid nucleic motllo fa possible la introducció de modificacions específiques, com ara dianes de restricció als extrems del DNA, mutagènesi dirigides, etc. També s'utilitza com a tècnica constituent d'alguna etapa d'altres metodologies com el 5'-RACE.

Les condicions d'amplificació depenen en gran part del fragment de DNA que es vol amplificar, així com de les característiques intrínseques dels *primers* d'elecció.

Els enzims més utilitzats per portar a terme la PCR han estat principalment la *EcoTaq* (ECOGEN), la *FastStart* (ROCHE) i la *PfuTurbo* (STRATGENE), aquestes dos últimes tenen la característica de ser força fidels. Per amplificar productes grans s'ha emprat la *LATaq* (TAKARA).

Els aparells utilitzats han estat el *Geneamp 2400* de Perkin Elmer i el *PCT-100™ Programmable Thermal controller*, de MJ Research.

Procediment:

Preparar la següent reacció sempre en gel:		Exemple d'un programa tipus d'amplificació per PCR:	
<i>Component</i>	<i>Concentració final</i>		
10x Taq <i>buffer</i>	1X	94°C	5min
MgCl ₂ 50mM	1.5mM	94°C	30s
dNTP mix 4mM	200µM	T _m °C* <i>primers</i>	30s
<i>forward primer</i> (10µM)	1µM	72°C	1min/Kb
<i>reverse primer</i> (10µM)	1µM	Repetir 30 vegades els passos 2-4	
Taq polimerase	1-2U totals	72°C	5min
DNA motlle*		4°C	
H ₂ O destil·lada estèril	fins a V final	*Temperatura d'anellament, sovint -5°C per sota de la T _m dels <i>primers</i> .	

*Les quantitats aproximades de DNA varien segons es tracti de DNA genòmic, plasmídic o cDNA.

En general sol ser entre 25-100ng de genòmic i 0.1-1ng de plasmídic.

2.2.3 Seqüenciació automàtica de DNA

Tota la seqüenciació ha estat realitzada en el servei intern de seqüenciació del centre. Per fer les reaccions s'han utilitzat els *ABI PRISM dRhodamine Terminator cycle sequencing ready* i, els *Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction kit V1.1* de PERKIN ELMER/Applied biosystems. El producte de les reaccions han estat analitzades amb el seqüenciador automàtic *ABI PRISM 310 genetic analyser* (PERKIN ELMER BIOSYSTEMS)

Les condicions de seqüenciació descrites a continuació estan optimitzades pel termociclador PERKIN ELMER *GeneAmp PCR system 2400*.

Seqüenciació de DNA plasmídic i/o productes de PCR

Procediment:

Preparar la reacció següent:		Dur a terme la reacció següent en el termo-	
<i>Component</i>	<i>Quantitat</i>	ciclador:	
H ₂ O estèril	fins a 20µL	96°C	2 min
DNA motlle	200ng PCR	96°C	10 s
	0.9-1µg plasmidis	T _m °C	5 s
Primer (5µM)	1 µL	60°C	4 min
Big Dye	4 µL	Repetir 25 cops els passos 2-4 4°C	

Precipitació de les seqüències

1. Afegir en un tub eppendorf:
 - 16 µL H₂O destil·lada
 - 64 µL d'etanol 95%
 - 20 µL de la reacció de seqüència
2. Barrejar i deixar precipitar 15 min a temperatura ambient.
3. Centrifugar 20 min a 14.000 rpm
4. Rentar el *pellet* amb 250 µL d'etanol 70%.
5. Assecar i guardar el *pellet* a 4°C fins a la seva utilització per punxar en el seqüenciador per part de l'encarregat del servei.

Seqüenciació del DNA de fag

Procediment:

Preparar la reacció següent:		Dur a terme la reacció següent en el termo-	
<i>Component</i>	<i>Quantitat</i>	ciclador:	
H ₂ O estèril	fins a 20 µL	97°C	3 min
DNA fag	1.5 µg	97°C	30 s
Primer (25µM)	1 µL	T _m °C	15 s
Big Dye	9.5 µL	60°C	4 min
		Repetir 30 cops els passos 2-4 4°C	

Precipitació de les seqüències

1. Afegir en un tub eppendorf:
 - 16 µL H₂O destil·lada
 - 64 µL d'etanol 95%
 - 20 µL de la reacció de seqüència
2. Barrejar i deixar precipitar 15 min a temperatura ambient.
3. Centrifugar 20 min a 13.000 rpm.
4. Descartar el sobrenedant amb pipeta.
5. Rentar el *pellet* amb 250 µL d'etanol 70%.
6. Assecar i guardar el *pellet* a 4°C fins a la seva utilització per punxar en el seqüenciador per part de l'encarregat.

2.3 Anàlisi de RNA

2.3.1 Northern blot

El Northern blot és una tècnica anàloga al Southern-blot (apartat 2.3.1). El concepte és el mateix però en aquest cas es treballa amb RNA; per tant s'han de pendre moltes

precaucions ja que el RNA es degrada molt fàcilment. Tots els reactius, material i tampons hauran de ser lliures de ribonucleases.

La mostra de RNA es prepara en condicions desnaturalitzants abans de ser carregada i es separa en gels desnaturalitzants d'agarosa/formaldehid.

La membrana i el protocol d'hibridació amb la sonda marcada és el mateix que l'utilitzat en la tècnica de Southern blot (apartat 2.3.1).

Procediment:

Electroforesi en gel d'agarosa desnaturalitzant

1. Preparació del gel de formaldehid;

V_{final} de 200 mL per un gel gran

MOPS	1%
Formaldehid	18%
Agarosa	1

Tot preparat en H₂O DEPC

2. L'agarosa en H₂O DEPC es desfà al microones i es deixa refredar fins aproximadament uns 60°C. S'afegeix a poc a poc el MOPS i el formaldehid tot remenant-ho i sota campana de fums. Abans que solidifiqui s'afegeix en el portagels de metacrilat.

3. Preparació de les mostres de RNA; es parteix de 15 µg de RNA total i es prepara seguint l'ordre següent:

H₂O DEPC fins al V_{final} de 40 µL

RNA total	15µg
Formamida	50%
Formaldehid	18%
MOPS	1X
Tampó de càrrega	1X

4. Les mostres es desnaturalitzen 10 min a 65°C.

5. Afegir 1 µL de BrEt per tal de poder visualitzar el RNA.

6. El gel es fa córrer a 60V durant 4-5h o a 20V *o/n* en tampó d'electroforesi MOPS 1X.

Transferència

7. Treure el gel de la cubeta d'electroforesi i depositar-ho en una safata, fer dos rentats de 30 min amb H₂O DEPC per tal d'eliminar el formaldehid residual.

8. Equilibrar el gel durant 45 min en 20X SSC.

9. Transferència del RNA per capil·laritat a una membrana de nylon Zeta Probe [BIO-RAD]. Es disposa el mateix muntatge experimental que en el cas del Southern-blot però en tampó 20X SSC.

10. Deixar transferir *o/n*.

11. Desmontar la transferència i deixar assecar la membrana.

12. Fixar el RNA a la membrana mitjançant irradiació amb UV.

13. Guardar les membranes seques entre dos paperes Whatmann 3MM fins a la seva utilització.

Hibridació

Veure protocol d'hibridació de la tècnica de Southern-blot.

2.3.2 RT-PCR

Amb la RT-PCR o transcripció inversa-PCR es pot amplificar un cDNA doble cadena a partir d'un mRNA determinat.

El kit utilitzat ha estat el *one-step RT-PCR kit* de GIBCO-BRL, que conté una barreja de transcriptasa inversa, una Taq polimerasa i un tampó amb la mix de reacció que ens permet portar a terme tota la reacció d'amplificació en un sol tub.

Les condicions emprades han estat les indicades per la casa comercial i ens ha permès

obtindre el cDNA amb un rendiment de síntesi òptim, en tot cas limitat per les característiques dels primers utilitzats.

2.3.3 Amplificació ràpida de l'extrem 5' del cDNA (5' –RACE)

La tècnica consta de dues etapes, en la primera es sintetiza el cDNA complementari a partir del mRNA. La cadena de DNA complementària s'ha obtingut a partir de mRNA poli(A)⁺ de ronyó de ratolí mascle adult de la soca 129/svJ. En la segona etapa s'amplifica l'extrem del cDNA mitjançant una sèrie de reaccions de PCR en cadena. S'utilitza l'enzim desoxinucleotidil terminal transferasa (TdT) i de dATP; que afegeix una cua de poli(A) en l'extrem 3' de la primera cadena de cDNA. A continuació es realitzen varies rondes de PCR *semi-nested*, amb primers *antisense* específics del gen i primers *sense* d'ancoratge a la cua de poli(A) afegida a l'extrem 5'.

Procediment:

Síntesi de la primera cadena de cDNA

Transcripció inversa:

1. Afegir en un tub mantingut en gel:
 - 1 µg de RNA total o 100ng de mRNA poli(A)⁺
 - 2 pmol totals de primer específic
 - H₂O DEPC fins a 12 µL
2. Escalfar 10 min a 70°C; afegir-hi:
 - 4 µL 5X 1st Strand Buffer
 - 2 µL DTT 0.1M
 - 1 µL dNTP mix 10mM
3. Barrejar i incubar 2 min a 48°C; afegir a continuació:
 - 1 µL (200U) SuperScript II Reverse Transcriptase [GIBCO-BRL]
4. Incubar 50 min a 48°C.
5. Inactivar l'enzim 10 min a 70°C.

Eliminació del RNA:

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

Purificació del cDNA:

Per la purificació del cDNA obtingut en la reacció anterior s'utilitzent els components i les instruccions del kit de QIAGEN i el de ROCHE (veure apartat 1.6) eluïnt finalment el DNA amb 30 µL.

Reacció de Tailing i Rondes d'amplificació per PCR

Tailing:

1. Muntar la següent reacció:
 - 10 µL de cDNA sintetitzat i purificat en la etapa anterior
 - 5 µL de 5X TdT buffer
 - 7.5 µL de CoCl₂ 5mM (1.5mM 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.

Primera ronda d'amplificació per PCR:

1. Afegir en un tub de PCR els següents components; treballant en gel:
 - 5 µL de 1e strand-AAAA cDNA
 - 5 µL de 10X PCR buffer [ja inclou el Mg²⁺ (15mM)]
 - 1 µL de dNTP mix 10uM
 - 1 µL de primer anchor APdT17 10µM
 - 1 µL de primer GSP-1 10µM
 - H₂O fins a 50 µL
 - 2.5U de Taq polimerasa
2. Iniciar la PCR en el termociclador:
 - 94°C 2min

94°C 15s
 55°C 30s
 72°C 30-60s
 Repetir 35 cops els passos 2-4
 4°C

Segona ronda d'amplificació per PCR:

3. (Opcional) Purificar la PCR anterior, eluint-la en 50µL.
4. Diluir (amb H₂O destil·lada) 1/20 i 1/100 els productes d'amplificació de la PCR anterior.
5. Muntar la segona PCR en gel (un tub per cada dilució del motlle de la 1era PCR):

1 µL de la 1era PCR (1/20 i 1/100)
 5µL de 10X PCR *buffer* (ja inclou el Mg²⁺ (15mM))
 1µL de dNTP mix 10µM
 1µL de *primer* AUAP 10µM
 1µL de *primer* GSP-2 10µM
 H₂O fins a 50µL
 2.5U de Taq polimerasa

6. Iniciar la PCR:

94°C 2min
 94°C 15s
 58°C 30s
 72°C 30-60s
 Repetir 35 cops els passos 2-4
 4°C

2.3.4 Primer extension

Tècnica utilitzada per determinar l'inici de transcripció d'un gen determinat. Està basada en l'anellament específic d'un *primer* del gen d'interès, complementari al seu mRNA, que s'exten mitjançant la transcriptasa inversa generant-se una cadena de llargada que correspon desde el punt d'inici de transcripció putatiu del gen fins al punt d'ancoratge marcat pel *primer*. Per tal de poder visualitzar la cadena resultant es marca el *primer* amb ³²P. Per conèixer la seqüència o llargària exacta del fragment amplificat es duu a terme una reacció de seqüenciació manual utilitzant el mateix *primer*, emprant com a motlle de DNA que compregui el punt d'anclatge del *primer* així com el putatiu inici de transcripció.

L'anàlisi dels fragments resultants, així com la reacció de seqüència es porta a terme en un gel de seqüència d'acrilamida/urea al 6 %.

Procediment:

Marcatge terminal d'oligonucleòtids a l'extrem 3'

1. Disposar la següent reacció de marcatge: V_{final} 10µL
 2 µL H₂O DEPC
 1 µL 10X PNTK tampó
 1 µL oligo 10µM (10pmol totals de *primer*)
 5 µL [³²P]ATP
 1 µL T4 polynucleotide kinase
2. Incubar la reacció de marcatge 30 min a 37°C.
3. Purificació (per gel-filtració) de l'oligonucleòtid marcat, utilitzant les microcolumnes *Microspin G-25*

(seguint les instruccions del fabricant). El volum final obtingut és d'aproximadament 50µL (~200fmol de primer/µL).

Annealing i extensió

1. Montar la següent reacció d'annealing: V_{final} 12 µL
 15 µg TNA total/1.5µg de RNA poli(A)⁺
 1 µL d'oligonucleòtid marcat (~200fmol)
 H₂O DEPC fins a un total de 12 µL

2. Desnaturalitzar la reacció 2 min a 90°C.
3. Deixar refredar lentament fins a assolir la T_m del *primer*.
4. Mantenir el tub a aquesta temperatura durant 30 min més.
5. Posar el tub en gel.

Extensió (reacció de transcripció inversa)

6. Afegir al tub anterior els següents components:
 - 4µL de 5x 1st Strand buffer
 - 1µL RNasin (40U/µL)
 - 1µL dNTP's mix 10mM
 - 1µL Superscript II RT 200U/µL (200U totals)
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 precipitar 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 sobrenadant i deixar assecar.
16. Dissoldre el pellet en 5 µL de tampó de càrrega, (es poden guardar a -20°C fins al seu anàlisi).
17. Analitzar els productes d'extensió en un gel vertical de seqüència d'acrilamida/urea al 6%.

Abans de carregar en el gel de seqüència, desnaturalitzar la mostra durant 10 min a 75°C.

Seqüenciació manual

La seqüenciació manual utilitzada està basada en el mètode de terminació pels dideoxinucleòtids descrits per Sanger F i col·laboradors (Sanger et al 1977). En aquest cas s'ha emprat el *kit ThermosequenaseTM* subministrat per USB, seguint el protocol indicat pel fabricant. Com a isòtop radiactiu s'ha utilitzat [$\alpha^{33}\text{P}$]dATP que ofereix una millor resolució respecte al ^{32}P facilitant la lectura de les bandes.

Procediment:

1. Desnaturalitzar el motlle de DNA (8 µL) amb 2 µL de NaOH 1M i en presència de 1 µL de *primer* (a 2 µM).
2. Incubar 10 min a 37°C, refredar en gel.
3. Neutralitzar amb 2 µL de HCl i 2 µL de PRB.
4. Incubar 10 min a 37°C. Pasar al gel.
5. Afegir 1 µL de DTT 0.1M, 2 µL de *labeling mix*; 1 µL de [$\alpha^{33}\text{P}$]dATP.
6. Incubar 5 min a temperatura ambient.
7. Aliquotar els dideoxinucleòtids en tubs separats (2.5 µL de ddATP, ddTTP, ddCTP i ddGTP).
8. Transferir 4.5 µL de la barreja obtinguda en el pas n°5 a cada un dels tubs de ddNTP.
9. Incubar 5 min a 37°C.
10. Aturar la reacció de marcatge amb 4 µL de *stop solution*.
11. Desnaturalitzar les mostres 2 min a 75°C i carregar-les al gel d'acrilamida/urea. Es poden guardar a -20°C com a màxim una setmana.

Assecar el gel a l'assecador sobre paper whatman 3MM i exposar-ho amb una pel·lícula autoradiogràfica de 12-20h.

3. CRIBATGE D'UNA LLIBRERIA GENÒMICA DE RATOLÍ

L'obtenció de clons genòmics s'ha realitzat mitjançant el cribatge d'una llibreria genòmica de ratolí comercial (*mouse genomic library*, λ FIXII, Stratagene) de fags lambda recombinants, construïda a partir de DNA genòmic de la soca 129 Sv/J. S'han sembrat –infectant la soca bacteriana apropiada– aproximadament 1 milió de clons independents en forma de calbes de lisi, repartides en vàries plaques grans que constituïran la llibreria genòmica. Es realitzen rèpliques de les plaques en membranes de nitrocel·lulosa, que seran hibridades amb sondes de cDNA del gen d'interès, marcades amb ^{32}P . Els clons identificats com a positius, seran sotmesos a successives rondes de purificació fins a aconseguir que un clon esdevingui un conjunt de fags idèntics derivats del fag positiu inicial.

Reactius:

- Plaques NZY
- MgSO_4 100mM
- Maltosa 20%
- Tampó SM
- Nitrocel·lulosa
- Bacteris XL-1 Blue MRA
- Tampó d'hibridació
- Solucions de rentat
- Llibreria genòmica

Procediment:

Titulació de la genoteca genòmica en fag λ FIXII

Preparació dels bacteris hoste

1. Inocular 50 mL de LB sense antibiòtic (suplementat amb Maltosa 0.2% i MgSO_4 10mM) amb una colònia aïllada de la soca XL-1 Blue MRA; fer-ho en un flascó gran per permetre l'aeració del cultiu.
2. Creïxer el cultiu *o/n* a 30°C amb agitació a 225-250 rpm.
3. Centrifugar els bacteris a 2000 rpm durant 2 min.
4. Resuspendre el *pellet* bacterià en un volum de 1-10 mL –segons grandària del *pellet*– amb MgSO_4 10 mM estèril.
5. Diluir la suspensió anterior amb MgSO_4 10mM fins a una $\text{OD}_{595\text{nm}}$ de 0.5. Es pot guardar a la nevera no més de 2-3 dies.

Infecció

6. Preparar amb tampó SM estèril unes dilucions seriades (1/10...1/10000) de la genoteca dels fags originals
7. Desfer el NZY-agarosa al microones

i fer aliquotes estèrils de 3 mL, mantenint-les a 48-50°C evitant que solidifiquin

8. Infectar 200 mL de bacteris de l'apartat n°5, amb 1 μL de cada una de les dil·lucions dels fags.
9. Incubar la barreja durant 15 min a 37°C amb agitació suau.
10. Afegir els 3 mL de “top-agar” en condicions estèrils al tub dels bacteris/fags i barrejar-ho per inversió vàries vegades.
11. Ràpidament abocar la mescla anterior sobre l'agar d'una placa de Petri de 90 mm –prèviament atemperada a 37°C– procurant que quedi coberta tota la superfície de la placa evitant que quedin bombolles.
12. Deixar solidificar; incubar les plaques a 37°C durant 8-12°C.
13. Comptar les calbes de lisi i fer el càlcul del títol aproximat de la genoteca original.

Títol (pfu/mL) = n° de calbes x factor de dilució x 10³

El títol aproximat de la genoteca de la que disposàvem fou ~1x10⁹ pfu/mL

Sembra de la genoteca λFIXII

Un cop determinat el títol de la genoteca es calcula la quantitat de fags necessaris per que a cada placa gran apareguin unes 100.000 clapes de lisi. Es plaquejaren al voltant de 1x10⁶ fags, repartits en 10 plaques de petri quadrades de 23x23 cm, assolint-se una densitat aproximada de 200 calbes/cm².

1. Preparar les plaques NZY-agar (~300mL/ placa) dos o tres dies abans. Abans de l'infecció s'atemperaran a 37°C.
2. Preparar bacteris XL-1 blue MRA O.D._{595nm} de 0.5 frescos, per ser infectats pels fags.
3. Prepara 10 tubs estèrils amb 45 mL cada un de top-agar líquid a 48-50°C.
4. Infecció: barrejar 1.8 mL de bacteris amb 1x10⁵ fags per placa, incubar-ho 15 min a 37°C amb agitació suau.
5. Sembra: barrejar els bacteris/fags amb el top-agar líquid i abocar-ho sobre el NZY-agar de les plaques grans quadrades, estendre-ho per tota la placa evitant les bombolles.
6. Deixar solidificar i incubar les plaques invertides en l'estufa de bacteris a 37°C durant 6-8 h, o fins que les calbes siguin apreciables. Es poden guardar a 4°C tancades amb parafilm.

Replicació de la genoteca en filtres de nitrocel·lulosa

Es realitzen dos rèpliques de cada placa amb membranes quadrades (22x22cm) de Duralose-UVTM [STRATEGENE].

1. Refrigerar les plaques a 4°C durant 1-2 h per tal que s'endureixi l'agar i evitar que es desenganxi al fer el *lifting*.
2. Numerar les plaques de la genoteca i tallar els filtres de duralosa (2 per placa), numerar-los també.
3. Estendre el filtre per sobre els fags evitant que quedin bombolles i mantenir-los 2 i 4 minuts per la 1era i 2ona membrana respectivament per tal que els fags s'enganxin a la duralosa per capil·laritat. Tot es realitzarà a la flama de la forma més estèril possible.
4. Abans de retirar els filtres marcar-los en els extrems amb una xeringa plena de tinta xina, per tal de poder-los orientar posteriorment.
5. Separar els filtres amb molta cura de l'agar i disposar-los cara amunt (on estan enganxats els fags mirant en amunt) sobre paper Whatmann 3MM impregnat de les solucions descrites a continuació.
6. Realitzar als filtres els tractament següents (les membranes sempre en posició dels fags mirant en amunt):
 - Desnaturalització, 2 min en NaOH 0.5M / NaCl 1.5M
 - Neutralització, 5 min en NaCl 1.5M / Tris-Cl 0.5M pH 8.0
 - Rentat, 30s en SSC 2X /Tris-Cl 0.2M pH 7.0
7. Deixar assecar els filtres cara

amunt.

8. Fixar el DNA a la duralosa amb UV al *crosslinker*.
9. Guardar els filtres fins a la seva utilització. Les plaques es poden guardar a 4°C per si s'ha de repetir l'*screening*.

Hibridació (*Cribatge primari*)

1. Escalfar la solució de prehibridació a ~42°C sense el DNA de salmó, aquest es bull 5 min i s'afegeix a la solució de prehibridació previament atemperat.
Hibridar els filtres en una carmanyola amb 200mL de tampó (solució de prehibridació):
 - Formamida desionitzada 50%
 - Pipes 2X
 - SDS 0.5%
 - DNA esperma de salmó a 100 µg/mL
2. Pre-hibridar els filtres a 42°C durant 3-4 h en agitació suau.
3. Marcar radioactivament la sonda.
4. Retirar de la carmanyola el màxim de tampó possible per tal que la hibridació es faci en el mínim volum possible (~125 mL).
5. Bullir la sonda 5 min i afegir-la a la carmanyola; utilitzar un mínim de 1×10^6 cpm/mL. La solució d'hibridació és la mateixa que la de pre-hibridació.
6. Hibridar a 42°C durant tota la nit (12-18h) amb agitació suau i constant.

7. Rentats:

- Dos rentats de 5 min amb SSC 1X / SDS 0.1% a RT
 - Tres rentats més de 15 min amb SSC 0.1X / SDS 0.1% a 65°C
8. Eliminar l'excés de líquid dels filtres hibridats i embolicar-los en plàstic per evitar que s'assequin. Exposar-los a -80°C amb films de raig X. S'han fet exposicions de 24-48h
 9. Revelar. Identificar els possibles positius, verificant-los amb les rèpliques i localitzar-los en les plaques mare.

Segon cribatge

1. Identificar a les plaques mare els clons positius, alineant els films amb les plaques.
2. Tallar un tros quadrat d'agar que enclogui el clon positiu, en condicions estèrils, i ficar-lo en un tub que contingui 1 mL de tampó SM i 20 µL de cloroform. Barrejar i guardar-lo a 4°C (és estable durant uns mesos).
3. Amb aquest clon postius infectar novament bacteris i sembra-los en plaques NZY-agar de 90 mm. Diluir la suspensió de fags per tal que quedin calbes aïllades.

Realitzar les rèpliques en nitrocel·lulosa i, hibridar-les com en passos anteriors es realitzaran tantes rondes de cribatge fins aconseguir purificar els clons positius, de manera que aconseguim que totes les calbes d'una placa donin senyal positiva. Normalment amb 3-5 rondes de *screening* ha estat suficient per aïllar els fags recombinants positius.

Conservació dels estocs de bacteriòfag lambda:

Els lisats de fags es conserven a -70°C amb DMSO al 7% (v/v). A l'hora de recuperar, els fags, punxar la superfície de l'estoc congelat amb una nansa de kolle, i escampar-la sobre l'agar d'un cultiu confluent de bacteris hostes. Incubar tota la nit a 37°C per obtenir calbes de lisi.

Deshibridació de membranes

Per tal de reutilitzar els filtres de la llibreria, Northern o Southern-blots, cal eliminar la sonda dels filtres abans de tornar-los a hibridar amb altres sondes, seguint el protocol següent.

1. Abocar un volum gran de SSC 0.1% / SDS 0.5% bullent sobre els filtres.
2. Mantenir-ho durant 15 min en agitació suau.
3. Repetir el pas 1-2 dues vegades més.
4. Deixar-los assecar sobre paper de filtre. Abans però, es recomana comprovar que no dongui senyal exposant-los com a mínim el temps necessari per veure la senyal de la sonda hibridada. Si passat aquest temps no obtenim marca es dona la membrana per deshibridada.

4. DNA RECOMBINANT

4.1 Clonatge i subclonatge de DNA

4.1.1. Clonatge estàndard de DNA

Per poder clonar fragments de DNA dins de vectors plasmídics, s'han utilitzat les tècniques estàndards de biologia molecular.

Els fragments de DNA a clonar (insert) s'obtenen digerint-los amb enzims de restricció creant-se extrems roms o cohesius depenent de l'enzim, idèntics als extrems del plasmidi acceptor o vector que ha estat linearitzat amb els mateixos enzims de restricció. Els extrems creats en el vector quan són compatibles, són defosforilats, per evitar la seva re-circularització. Un cop lligat l'insert al vector es transformen bacteris competents per tal d'obtenir colònies que continguin el constructe amb l'objectiu de tenir-ne molta quantitat i disposar-ne sempre que es vulgui.

Digestió de DNA

Totes les digestions s'han realitzat amb enzims de restricció de les cases BOEHRINGER MANNHEIM-ROCHE i TAKARA una concentració d'aproximadament 2U/ μ g de DNA. Les temperatures utilitzades han estat les indicades pel proveïdor i els temps de digestió han variat entre 2-18h.

Defosforilació del vector

S'ha utilitzat l'enzim comercial fosfatasa alcalina, CIAP (*Calf Intestina Alkaline Phosphatase*) de ROCHE.

Procediment:

- | | |
|---|--|
| 1. Digerir el plàsmid (~10 μ g) i
comprovar que s'hagi assolit una
digestió completa. | 1U de l'enzim CIAP (1U/ μ L) |
| 2. Afegir a la digestió:
1X de 10X CIAP <i>buffer</i> | 3. Barrejar i incubar 60 min a 37°C.
4. Inactivar la fosfatasa 15 min a 65°C. |

Lligació entre vector i l'insert

El vector i l'insert es purifiquen a partir de gel d'agarosa seguint el protocol exposat en l'apartat 1.5. Abans de la lligació es calcula la concentració aproximada de vector (V) i insert (I) i s'utilitza normalment la relació molar I:V de 3:1.

Al llarg de la tesi s'han portat a terme dos protocols, el primer mitjançant la lligasa de T4 de PROMEGA i el segon emprant un *kit* comercial el *Rapid ligation kit* de ROCHE:

Protocol núm 1:

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

Quantitat	Components
Fins a 10 µL	H ₂ O destil·lada estèril
1 µL	10X T4 DNA <i>buffer</i>
X µL*	Vector
Y µL*	Insert
1 µL	T4 DNA <i>ligase</i>

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

*La quantitat dependrà de la relació molar utilitzada.

Protocol núm 2:

1. Realitzar la següent reacció en un microtub

Quantitat	Components
Fins a 10 µL	H ₂ O destil·lada estèril
2 µL	<i>Buffer 2 (5X)</i>
X µL*	Vector
Y µL*	Insert

2. Afegir 10 µL del *Buffer 1 (2X)*
3. Afegir 1 µL *Buffer 3 (enzim)*
4. Incubar a RT (22-25°C) de 5-60 min
5. Congelar o transformar

*La quantitat dependrà de la relació molar utilitzada.

4.1.2 Clonatge de productes de PCR

Algunes polimerases com la Taq presenten la característica d'afegir adenosines protuberants als extrems 3' terminal de la cadena amplificada anomenada activitat adenosina transferasa 3' terminal. Alguns vectors comercials aprofiten aquesta propietat i presenten una desoxitimidina terminal a cada un dels seus extrems 3', de manera que aquests extrems són compatibles amb els del producte de PCR.

S'han utilitzat dos *kits* comercials per clonar productes de PCR; el *pGEM-T vector systems* de PROMEGA i, el *TOPO-cloning* de la casa INVITROGEN, en aquest *kit* el vector és el pCR2.1-TOPO que està activat amb la Topoisomerasa I unida covalentment en els seus extrems, permetent una reacció de lligació molt més ràpida i eficient.

Es parteix en tots els casos de productes de PCR purificats ja sigui a partir de gel d'agarosa (apartat 1.5) com purificats directament amb un *kit* comercial (apartat 1.6).

Protocols de lligació:

A) En el cas d'utilitzar el vector *pGEM-T* o el seu derivat *pGEM-T Easy*, s'ha seguit el següent protocol:

1. Preparar la següent reacció en un microtub:

Fins a 10 µL	H ₂ O destil·lada
1 µL	10x T4 DNA <i>buffer</i>

- | | |
|--------|------------------------|
| 1 µL | Vector (50 ng) |
| 1-4 µL | Producte PCR purificat |
| 1 µL | T4 DNA lligasa 3U/µL |
2. Barrejar per pipeteig i incubar la reacció a 4°C tota la nit.
 3. Guardar-la congelada o transformar-la.

B) En el cas del *TOPO-Cloning* el protocol ha estat el següent:

1. Preparar la següent reacció en un microtub:

Fins a 6 μL	H_2O estèril
0.5-4 μL	Producte PCR purificat

1 μL	<i>Salt solution (kit)</i>
-----------------	----------------------------

1 μL	Vector TOPO (<i>kit</i>)
-----------------	----------------------------

2. Barrejar per pipeteig i incubar la reacció a RT (22-25°C) durant 5-10 min.
3. Guardar-la congelada o transformar-la.

4.2 Transformació de bacteris compentents

4.2.1 Preparació de bacteris competents per electroporar

La soca d'*Escherichia coli* utilitzada ha estat JM109; per obtindre els bacteris competents s'han seguit les instruccions detallades en el manual de l'aparell d'electroporació.

Procediment:

1. Fer un *streak* amb la nansa de kolle a partir d'un glicerolat de JM109 guardat a -80°C, en una placa de LB sense antibiòtic. Creixer els bacteris a 37°C *o/n*.
2. Creixer un minicultiu líquid (3mL de LB sense antibiòtic) a partir d'una colònia aïllada a 37°C *o/n*.
3. Amb 1 mL del cultiu fresc inocular un erlenmeyer de dos litres amb 500 mL de LB. Incubar-ho a 37°C amb agitació (225rpm) fins que el cultiu assoleixi un $\text{O.D}_{595\text{nm}} \sim 0.7-0.8$ (fase exponencial).
4. Deixar el cultiu en gel durant 15 min.
5. Centrifugar a 3500rpm durant 15min a 4°C; descartar el sobrenedant.
6. Resuspendre el *pellet* en 500 mL d' H_2O destil·lada estèril (4°C).
7. Repetir el pas 5.
8. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 250 mL d' H_2O destil·lada freda i estèril. Repetir el pas 5.
9. Resuspendre els bacteris amb 10 mL de glicerol al 10% estèril. Repetir el pas 5.
10. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 1-2 mL de glicerol al 10% fred i estèril. Repartir els bacteris en alíquotes de 40 μL i congelar-les ràpidament en un bany de acetona/neu carbònica. Conservar les cèl·lules competents a -80°C

4.2.2 Electroporació

S'ha utilitzat l'aparell *Bio-Rad Gene PulserTM* de BIO-RAD amb cubetes d'electroporació de 0.2 cm. S'han seguit les instruccions facilitades amb l'aparell:

1. Descongelar les alíquotes de 40 μL de bacteris competents i mantenir-les en gel.
2. Afegir 1-3 μL de lligació (~50ng de DNA) per alíquota de bacteris i incubar 1 min en gel.
3. Transferir la barreja a la cubeta d'electroporació prèviament refredada a 4°C.
4. Condicions d'electroporació:

Resistència	200
Capacitància	25 μF
Voltatge	2.5kV

5. Realitzar el pols amb els paràmetres seleccionats.
6. Afegir a la cubeta 1 mL de LB, recuperar tot el volum i incubar a 37°C durant 45 min amb agitació (225rpm).
7. Sembrar 100 µL de la transformació en plaques de medi selectiu, que permeti seleccionar els transformants.

4.2.3 Transformació per xoc tèrmic

En aquest cas s'han utilitzat els bacteris *One-shot TOP-10* d'*E.coli*, de la casa comercial INVITROGEN. Ofereixen una elevada eficiència de transformació de 107-108 cfu/µg.

Procediment:

1. Afegir 2-4 µL de la reacció de lligació (serveix qualsevol de les descrites anteriorment) als bacteris competents, tot en gel.
2. Incubar un mínim de 30 min en gel.
3. Realitzar el xoc tèrmic; incubar els bacteris 30s a 42°C.
4. Transferir els tubs en gel i deixa-los 2 min.
5. Afegir 250 µL de medi SOC prèviament atemperat.
6. Incubar a 37°C amb agitació (225rpm) durant 1h.
7. Sembrar 1µL-250 µL de bacteris –depenent del DNA transformat– en plaques LB amb medi selectiu. Incubar a 37°C *o/n*.

4.3 Mutagènesi

La mutagènesi *in vitro* d'un punt concret del DNA serveix per l'estudi de funcions relacionades amb l'estructura de proteïnes, identificació de regions intra-moleculares o d'aminoàcids, que poden estar mediat per l'expressió d'un gen o bé per un vector d'expressió.

El *kit* utilitzat és el *Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis kit* de la casa comercial STRATAGEN; aquest *kit* ens permet generar mutants a partir de dsDNA d'una manera ràpida i amb una eficiència del 80%. El procediment bàsic utilitza un vector qualsevol amb l'insert d'interés i dos *primers* iguals *sense-antisense* que contenen la mutació. Els *primers* s'extreuen amplificant tot el vector utilitzant la *Pfu Turbo DNA polymerase* que presenta una elevada fidelitat en la síntesi del DNA. El producte es tracta amb endonucleasa DpnI (seqüència *target*: 5-Gm6ATC-3') especialitzada en DNA metilat i hemimetilat digerint el DNA motllo. El DNA resultant es transformat en *E.coli* que el metila i repara els *nicks* del DNA mutat.

Procediment:

1. Muntar la reacció següent:

5 µL	10x Buffer Pfu Turbo
0.5 µL	DNA (100ng/µL)
1.25 µL	<i>forward</i> (10 µM)
1.25 µL	<i>reverse</i> (10 µM)
2.5 µL	dNTP's (4mM)
1 µL	Pfu Turbo (2.5U/µL)
37 µL	H ₂ O
2. Fer el programa següent en un termociclador:

1) 95°C	30s
2) 95°C	30s
3) 55°C	1min
4) 68°C	12min*
5) Repetir els passos 2-4,16 vegades.	

- 6) 4°C ∞
 *2min/1Kb DNA
3. Afegir 1 µL de DpnI (10U/µL) directament a la reacció d'amplificació.
4. Incubar 1 h a 37°C.
5. Transformar 1 µL de la reacció en *E.coli* competent, bàsicament hem utilitzat les Top10 (apartat 4.2.3)

5. RADIATION HYBRID PANEL (MAPATGE D'HÍBRIDS PER RADIACIÓ)

S'ha utilitzat el panel comercial WGRH de ratolí / hámster T31 de Goodfellow (McCarthy *et al* 1997), de la casa comercial RESEARCH GENETICS. El panel s'ha elaborat fusionant cèl·lules primàries d'embrió de ratolí (129aa) irradiades amb 3000 *rad* amb cèl·lules de hámster A23, deficientes 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 S_A en ratolí, s'han utilitzat dos *primers* situats en la regió intrònica que es troba entre el 3er i 4art exò amplificant un producte de 204 pb, veure taula 10.

Reacció i condicions de la PCR:

<i>Quantitat</i>	<i>Components</i>		
10.3 µL	H ₂ O destil·lada	1) 94°C	8 min
1 µL	DNA genòmic (25ng)	2) 94°C	30 s
2 µL	10X <i>EcoTaq</i> <i>buffer</i>	3) 62.5°C	30 s
0.6 µL	MgCl ₂ 50mM	4) 72°C	25 s
2 µL	<i>forward primer</i> 10µM	5) Repetir els passos 2-4, 30 vegades	
2 µL	<i>reverse primer</i> 10µM	6) 72°C	5 min
0.5 µL	<i>Eco Taq</i> (2.5 U totals)	7) 4°C	∞

Es realitzen les PCR corresponents utilitzant com a motlle cada un dels clons i a continuació es corre un gel d'agarosa al 2%. Les 102 PCRs es realitzen mínim dos cops, al final s'anota el número de tots els clons on s'ha produït amplificació (una banda corresponent a les 204bp) i es tradueix a un codi binari de 0 i 1, on el 0 és negatiu i l'1 és un clon positiu. S'ha fet servir el termociclador *Perkin Elmer genamp 9600*, que permet realitzar en paral·lel 96 reaccions en el mateix programa.

6. CULTIUS CEL·LULARS I TRANSFECCIONS

6.1 Cultius cel·lulars

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% de CO₂. En tots els casos s'ha procedit en les condicions estàndards requerides pel treball en cultius (Davis, 2002).

6.1.1 Tripsinització

En el manteniment de cada línia cel·lular, els flascons de cultiu s'han tripsinitzat cada 3-4 dies aproximadament, segons la velocitat de creixement particular de cada línia cel·lular, essent recomanable quan un cultiu ha assolit un 85-100% de confluència.

Reactius:

- PBS 1X estèril
- Tripsina-EDTA [BIOLOGICAL INDUSTRIES]

Procediment:

1. Temperar el PBS 1X, la tripsina i el medi de cultiu a 37°C.
2. Rentar les cèl·lules amb PBS 1X estèril.
3. Afegir la tripsina, 3mL / flascó T-25 (25cm³ de volum).
4. Tancar del tot els flascons i deixar-los a l'incubador a 37°C durant 5-10 min o fins que les cèl·lules estiguin del tot desenganxades.
5. Recollir la tripsina/cèl·lules i passar-ho a un tub que contingui mínim un volum de medi de cultiu, aconseguirem així neutralitzar la tripsina.
6. Centrifugar 5 min a 1000 rpm (4°C).
7. Aspirar el medi i resuspendre el *pellet* en un volum de medi de cultiu adequat; normalment 1-2 mL.
8. Sembrar les cèl·lules en un nou flascó o placa de cultiu.

6.1.2 Recompte de cèl·lules

Després de tripsinitzar es fa un comptatge aproximat de la quantitat de cèl·lules que tenim per poder sembrar la densitat desitjada.

Reactius:

- Blau de Tripà [SIGMA]
- Cambra de Neubauer

Procediment:

1. Preparar una dilució 1:10 de cèl·lules en blau de tripà.
2. Omplir la cambra de Neubauer amb 10 µL de la dilució, comptar el número de cèl·lules viables (les cèl·lules refringents que no han incorporat el blau de tripà).
3. Fer el càlcul següent:
$$\text{núm. cels / mL} = \text{núm. cèl·lules promig} \times 10 \times 10^4$$
4. Sembrar la quantitat desitjada.

6.1.3. Conservació de cèl·lules

Les cèl·lules eucariotes es mantenen durant molt de temps en nitrogen líquid (~-130°C). El protocol de congelació que s'ha utilitzat més sovint és el descrit a continuació.

Procediment:

1. Tripsinitzar el cultiu cel·lular.

2. Posar en gel el criotubs amb 100 μ L de DMSO estèril, espera que solidifiqui.
3. Afegir-hi 900 μ L de la suspensió cel·lular i barrejar per inversió fins que el DMSO líquid.
4. Congelar immediatament a -20°C .
5. Un cop congelat (1-2 h) passar els vials a -80°C (1 h-*o/n*).
6. Conservar les cèl·lules indefinidament en el tanc de N_2 líquid.

6.1.4 Descongelació de cèl·lules

El procés de descongelació ha de ser ràpid per obtenir el nombre màxim de cèl·lules vives.

Procediment:

- | | |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Treure els vials de cèl·lules del tanc i descongelar-les fins a un 80% en un bany a 37°C. 2. Afegir als criotubs 1 mL de cultiu fred gota a gota. 3. Passar tot el volum a un tub que contingui 8 mL de medi fred. | <ol style="list-style-type: none"> 4. Centrifugar 5 min a 1000 rpm (4°C). 5. Descartar el sobrenedant i resuspendre el <i>pellet</i> amb un volum adequat de medi. 6. Sembrar en un flascó de cultius la totalitat de les cèl·lules. |
|--|--|

6.2 Deplecció del sèrum fetal d'esteroides

El sèrum boví fetal que s'utilitza per preparar els medis de cultiu conté entre d'altres components un conjunt d'hormones esteroïdals com els andrògens, estrògens, etc. En aquest cas es realitzen estudis d'activitat promotora induïda per andrògens per tant és imprescindible eliminar-los del medi per obtenir una inducció androgènica controlada. S'utilitza per tal efecte carbó actiu; totes aquelles molècules de natura esteroïdal s'enganxen a la superfície del carbó actiu eliminant-les fàcilment amb una simple centrifugació.

Procediment:

1. Barrejar 50 mg de carbó actiu (Carchoal, NORIT A) per cada mL de sèrum.
2. Incubar amb agitació orbital durant 30 min a temperatura ambient.
3. Centrifugar 10 min a 12.000 rpm per sedimentar el carbó actiu.
4. Esterilitzar el sèrum depleccionat passant-lo per filtre de 0.22 μm .
5. Guardar a -20°C .

6.3 Transfecció transitòria

La transfecció consisteix en la introducció de DNA plasmídic dins de cèl·lules eucariotes en cultiu, existeixen diferents mètodes com és l'electroporació, l'ús de fosfat càlcic o les vesícules lipídiques. En aquest treball s'han utilitzat els liposomes, concretament 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-propanamino trifluoroacetato (DOSPE) i el lípid neutre dioleil fosfatidiletanolamina (DOPE). El reactiu Plus s'acomplexa amb el DNA afavorint la unió amb els liposomes,

augmentant l'eficiència de transfecció.

A continuació es descriu el protocol de transfecció transitòria optimitzat per les línies cel·lulars PCT3 i PR10.

Procediment:

1. El dia anterior a la transfecció, sembrar la quantitat de cèl·lules adequada per cada tipus de placa, tal com s'especifica en la taula 11, per tal que en el moment de la transfecció estiguin en un 70-80% de confluència.
2. Barrejar el DNA amb el reactiu Plus en medi OPTI-MEM, segons les quantitats expressades en la taula 11, incubar 15 min a temperatura ambient.
3. Diluir la LIPOFECTAMINA en OPTI-MEM.
4. Barrejar el DNA-PLUS amb la LIPOFECTAMINE i incubar 15 min a temperatura ambient.
5. Rentar les cèl·lules dues vegades amb OPTI-MEM temperat a 37°C.
6. Afegir a les cèl·lules la barreja final de la transfecció, els volums són específics per cada placa i estan indicats en la taula 11.
7. Incubar a l'incubador de cultius durant 3h.
8. Rentar les cèl·lules amb PBS 1X temperat a 37°C i afegir-hi medi complet.

Taula 11. Quantitats i volums de transfecció.

Mida de la placa	Cèl·lules a sembrar	DNA (μ g)	Plus (μ L)	Lipofectamina (μ L)	Volum final de transfecció (mL)
24 pous	50.000	0.3	4	1	0.250
6 pous	250.000	2.5	6	4	1.0
60 mm	0.5×10^6	5	8	12	2.0
100 mm	1.5×10^6	15	20	30	5.0

6.4 Construcció de plasmidis reportadors recombinants

Totes les construccions plasmídiques han estat generades mitjançant els mètodes estàndard de biologia molecular i DNA recombinant. Per obtenir els diferents fragments del promotor murí del gen S_A , es van dissenyar primers específics amb els que es va amplificar per PCR i posteriorment subclonar en el vector *pGL3basic*, que codifica pel gen reporter luciferasa.

Els primers utilitzats es descriuen en la taula 10. El primer *forward* especifica el fragment de promotor amplificat, en tots els casos s'ha utilitzat el mateix primer *reverse* (PROM1KbL). Com a motlle de les reaccions per realitzar els diferents constructes s'utilitzà el fragment major de promotor clonat d'1Kb i com a polimerasa la *Pfu Turbo*[®] (STRATAGENE) per evitar errors. Per obtenir les 2Kb de promotor i per raons de mapa de restricció,

Taula 12. Construccions reportadores del promotor de S_A

Nom	Posicions
-2000Luc	-2Kb/+40pb
-1000Luc	-1Kb/+40pb
-904Luc	-904pb/+40pb
-747Luc	-747pb/+40pb
-639Luc	-639pb/+40pb
-496Luc	-496pb/+40pb
-331Luc	-331pb/+40pb
-210Luc	-210pb/+40pb
-110Luc	-110pb/+40pb
-72Luc	-72pb/+40pb

s'han hagut d'utilitzar *primers* amb una diana diferent, veure taula 10.

S'han generat un total de 10 construccions reportadors especificades en la taula 12. L'orientació correcta i l'absència de mutacions es van verificar per seqüenciació.

6.4.1 Transfecció transitòria de construccions reportadores

Per l'estudi del promotor del gen S_A *in vitro*, s'han utilitzat les construccions presentades en l'apartat anterior. Les cèl·lules són transfectades transitòriament amb aquestes construccions, més un control intern per normalitzar l'eficiència de transfecció de cada mostra; per aquest control intern s'ha utilitzat un plàsmid que codifica per l'enzim fosfatasa alcalina secretada (SEAP).

El ratio molar vector Luc/SEAP utilitzat és 1:25 i els assajos d'activitat tan luciferasa com SEAP es duen a terme a les 48h.

Generalment s'han utilitzat plaques de 24 pous, transfectades de la manera descrita en l'apartat següent. De cada construcció, es realitza de 3-6 rèpliques (3-6 pous de la placa de 24) per cada assaig de transfecció.

L'esquema seguit es pot resumir de la següent manera:

1) 24h Pre-transfecció Sembrar 50.000 cèl·lules/pou (placa de 24)

2) Transfecció Transfectar amb les quantitats següents:

0.3 µg totals de DNA/pou	
0.288 µg constructe-Luc	0.012 µg pSEAP-basic

3) 24h Post-transfecció Canvi de medis de cultius (1mL/pou)

4) 48h Post-transfecció Recollida de medis i lisat cel·lular per mesurar l'activitat SEAP i luciferasa respectivament

Quan és necessari cotransfectar els plàsmids que contenen els diferents receptors com PPAR α o RXR, les quantitats de DNA transfectades per pou varien. A més, quan es realitzen induccions i tractaments hormonals en cotransfectar el vector d'expressió del receptor d'andrògens murí *pmAR*, s'ha de tenir en compte que les cèl·lules sembrades abans de ser transfectades, han d'estar en medi depleccionat d'esteroides.

En tots els casos s'utilitza un plàsmid irrellevant, el *pBlueScriptII*, per normalitzar la quantitat de DNA transfectada en cada pou.

1) 24h Pre-transfecció Sembrar 50.000 cèl·lules/pou (placa de 24)

2) Transfecció Transfectar amb les quantitats següents:

Situació Receptor-			Situació Receptor+		
0.45 µg totals de DNA/pou			0.45 µg totals de DNA/pou		
0.288 µg constructe-Luc	0.012 µg pSEAP-basic	0.15 µg pBlueScriptII	0.288 µg constructe-Luc	0.012 µg pSEAP-basic	0.15 µg plasmidis amb diferents receptors

Després de 3h de transfecció s'afegeix medi condicionat amb o sense andrògens, segons el cas, quan es realitzen induccions amb el plàsmid del receptor d'andrògens

- | | |
|-------------------------|---|
| 3) 24h Post-transfecció | Canvi de medis de cultius (1mL/pou) |
| 4) 48h Post-transfecció | Recollida de medis i lisat cel·lular per mesurar l'activitat SEAP i luciferasa respectivament |

6.5 Assaig dels gens reportadors

6.5.1 Assaig d'activitat luciferasa

Per mesurar l'activitat de la luciferasa a partir d'un lisat cel·lular s'ha utilitzat el *kit Luciferase assay systems* de PROMEGA, la luciferasa hidrolitza el substrat luciferina en presència d'ATP i altres cofactors produïnt llum que es pot llegir en un luminòmetre.

Procediment:

Normalment es recullen les cèl·lules a les 48h després d'haver-les transfectat transitòriament, havent realitzat un canvi de medi entremig a les 24h. Abans de començar el protocol recollir els medis de cultiu per fer l'assaig SEAP.

1. Treure el tampó de lisi CCLR 5X de -20°C i deixar-ho temperar a RT.
2. Diluir el 5X CCLR 1/5 amb H₂O milliQ.
3. Descongelar el substrat LAR (*luciferase assay reagent*), mantenir-ho en fred i protegit de la llum.
4. Rentar les cèl·lules dos cops amb PBS 1X fred.
5. Afegir el tampó de lisi CCLR 1X (175 µL per pou de placa de 24).
6. Deixar les plaques en agitació molt suau durant 10-30 min.
7. Recollir el lisat i passar-ho a un *eppendorf*.
8. Centrifugar 30 s a màxima velocitat.
9. Transferir el sobrenedant a un nou tub *eppendorf* o directament a la placa de 96 pous. Es pot guardar els tubs/plaques a -80°C.
10. Afegir 10 µL de cada lisat en una placa de 96 pous opaca de luminòmetre.
11. Carregar l'injector del luminòmetre. Injecta 50 µL de LAR per pou.

6.5.2 Assaig d'activitat SEAP

Les cèl·lules es contransfecten amb el vector pSEAP2-basic que expressa la fosfatasa alcalina que es secreta al medi. S'utilitza per normalitzar les diferents eficiències de transfecció. L'assaig es basa en una reacció enzimàtica catalitzada per la fosfatasa alcalina, en la qual s'hidrolitza un substrate quimioluminiscet (el CSPDTM) emetent llum que es pot registrar en un luminòmetre. El *kit* utilitzat és el *Great EscAPETM SEAP Reporter system 3* [CLONTECH].

Procediment:

1. Treure el *kit* i deixar temperar a RT.
2. Diluir el tampó de dilució 5X 1/5 amb H₂O milliQ.
3. Recollir 175 µL de medi de cada pou a les 48h i passar-ho a un *eppendorf*.
4. Centrifugar 15 s a màxima velocitat.
5. Transferir el sobrenedant a un nou tub o directament a una placa de 96 pous de PCR.
6. Afegir 10 µL de medi en una placa de PCR de 96 pous.
7. Afegir 30 µL 1X *dilution buffer*.

8. Incubar 30 min a 65°C (en el *PE 9600*).
9. Refredar les mostres breument en gel, després temperar a RT.
10. Afegir 40 µL d'*assay buffer* a cada pou i barrejar.
11. Incubar 5 min.
12. Traspassar la barreja de cada pou a una placa opaca de 96 pous de luminòmetre.
13. Preparar el substracte, diluint 1/20 el substrat CSPD amb el *chemiluminiscent enhancer* (mantenir-ho protegit de la llum).
14. Afegir 40 µL del substrat diluït a cada pou i barrejar lleugerament. Tapar la placa amb paper d'alumini per manteni-la a les fosques.
15. Incubar 10 min a RT.
16. Llegir la placa al luminòmetre.

7. ASSAIG DE RETARD EN GEL O EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

La interacció de certes proteïnes amb el DNA és el control central de molts processos cel·lulars incloent la replicació del DNA, recombinació, reparació i transcripció. Una de les tècniques basades en l'estudi de la regulació gènica i la determinació de les interaccions proteïna-DNA és l'EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) o Band Shift.

La tècnica EMSA es basa en l'observació de la migració del complex proteïna-DNA que és més lenta que la molècula de DNA lliure, en un gel de poliacrilamida no-desnaturalitzant. Per tant la migració del DNA es retarda (d'aquí el nom *shift*) quan està unida a una proteïna.

L'assaig EMSA es pot utilitzar de manera qualitativa en la identificació de seqüències específiques de DNA d'unió a proteïnes com els factors de transcripció; utilitzant per exemple extractes nuclears crus o proteïnes obtingudes per transcripció i traducció *in vitro*.

7.1 Extracció nuclear a partir de ronyons i fetges de ratolí

Cal realitzar tot el procediment a 4°C, mantenint totes les solucions en gel.

Reactius:

- Quantitat de teixit: 20 ronyons de ratolí
5-6 troços de fetge de ratolí
- *Tampó d'homogenització (TH)*

Hepes 1M pH7.6	10 mM
KCl 2M	25 mM
EDTA 0.25M	1 mM
sacarosa 2.4M	2 M
glicerol 99%	10%
espermina 0.25M	0.1 mM
espermidina 1.377M	0.5 mM
PMSF 100 mM	0.5 mM
benzamidina 2.5M	2.5 mM
aprotinina 5 mg/mL	10 µg/ml
leuptina 1 mg/ml	1 µg/ml
pepstatina 1 mg/ml	1 µg/ml
- *Tampó de lisi (TL)*

Hepes 1M pH7.6	10 mM
KCl 2M	100 mM
EDTA 0.25M	0.1 mM
MgCl ₂ 1M	3 mM
glicerol 99%	10%
PMSF 100 mM	0.5 mM
DTT 1M	1 mM
benzamidina 2.5M	2.5 mM
aprotinina 5 mg/mL	10 µg/ml
leuptina 1 mg/ml	1 µg/ml
pepstatina 1 mg/ml	1 µg/ml
- Sulfat amònic 3.29M

Procediment:*Homogenització de teixits*

1. Matxucar els teixits en un morter (fins que sigui pols), col·locat sobre neu carbònica.
2. Colocar "la picada" a l'homogenitzador en 12 mL de TH. Homogenitzar 6 o 7 cops mantenint la mostra en gel.
3. Repartir l'homogenat entre 6 tubs de rotor basculant tipus SW55Ti Beckman, als quals haurem dipositat prèviament un coixí d'1mL de TH. Rentar el *dounce* 2 cops amb un màxim de 12 mL de TH i tornar-ho a repartir entre els tubs. Pesat els tubs.
4. Centrifugar a 26.000 rpm a 2°C durant 30 min. Preparar el buffer TH:glicerol 9:1.
5. Retirar la capa superficial de restes de teixit i descartar el sobrenedant (sn).
6. Ressuspendre el *pellet* amb 1mL de TH:glicerol suaument per no trencar els nuclis.
7. Fer dos rentats, amb 800 µL cadascun, de cada tub i passar el *pellet* i els rentats a uns altres tubs de rotor basculant on prèviament haurem posat 2 mL de TH:glicerol. Pesat els tubs.

8. Centrifugar a 26.000 rpm a 2°C durant.

30 min al rotor basculant SW55Ti.

Lisi nuclear

9. Decantar el sn i ressuspendre el *pellet* en 1,5mL de TL. Passar-ho tot a 2 tubs.
10. Precipitar les proteïnes afegint 1/10 part del volum de sulfat amònic 3.9M gota a gota i agitant el tub per evitar que precipitin per l'excesiva concentració de sulfat amònic. Pesat els tubs.
11. Agitació horitzontal durant 30min.
12. Centrifugar a 35.000 rpm a 0°C durant 60 min.
13. Passar el sn a un altre tub medint el volum, vigilant de no arrossegar el precipitat que conté DNA i proteïnes associades.
14. Afegir al sn, sulfat amònic en pols (0.3 g/ml de sn). Agitar per inversió i deixar en gel 20 min.
15. Centrifugar 20 min a 35.000 rpm.
16. Descartar el sn i assecar les parets del tub amb compte. Pot deixar-se en gel fins al dia següent.
17. Ressuspendre el *pellet* en 600 µL de TD (TL menys MgCl₂).

7.2 Tècnica d'EMSA**Procediment:***Marcatge de la sonda*

1 µL oligo *reverse* (10µM)

1 µL *Buffer* PNK 10X

1 µL T4 Kinasa

1 µL [γ ³²P]ATP

6 µL H₂O

Incubar a 37°C durant 1h

Aïllar els oligos marcats amb les columnes de Microspin G25.

Precipitació sonda

1. Afegir als oligos purificats:

5 µL poliacrilamida 0.25%

6 µL NaCl 4M

180 µL EtOH 100%

2. 10 min a -20°C.

3. Centrifugar 10 min a màxima velocitat.

4. Rentar el *pellet* amb EtOH 70%.

5. Deixar-ho 10 min a -20°C.

6. Centrifugar 10 min a màxima velocitat.

7. Ressuspendre el *pellet* amb 30 µL d'1X *buffer* M.

8. Afegir 1.3 µL d'oligo *forward* (10 µM).

Anellament

1. Bullir H₂O destil·lada en un vas de precipitats de vidre.
2. Posar-ho a sobre d'una placa escalfadora en agitació fins que torni a bullir.
3. Afegir-hi les sondes en un flotador i en agitació durant 3 min.
4. Apagar la placa escalfadora però no l'agitació i deixar-ho *o/n*.

Purificació de la sonda

1. Fer un gel de poliacrilamida al 8% en TBE 0.5X.
2. Precorre'l a 350V, 16mA, de 10-20 min. Tampó d'electroforesi, TBE 0.5X.
3. Afegir a les mostres 10 µL de tampó de càrrega i carregar el gel.
4. Deixar corre el gel fins que el front arribi més o menys a la meitat.
5. Retallar la banda que correspongui a l'oligo anellat.
6. Afegir el taquet d'acrilamida en un tub que contingui 500 µL de TE.
7. Deixar-ho *o/n* en agitació orbital a RT, precipitar la soda i resupendre en TE.

Incubació amb l'extracte

1. Preparar el *binding buffer* 2X (2xBB)

1M Tris.HCl pH 7.6	40mM
2.5M KCl	150mM
1M DTT	2mM
99% Glicerol	20%
NP40 10%	0.5%
2. Preparar la mostra afegint:

10 µL	2XBB
6 µg	Extracte nuclear
0.2 µL	poly dIdC 1ug/µl
0.1 µL	DTT 1M
0.5 µL	BSAAc 100ng/µL
500 cpm	de sonda
H ₂ O	fins a 20 µL
3. Incubar les mostres a 37°C durant 30 min.
4. Preparar un gel d'acrilamida al 5% en TBE 0.5%.
5. Carregar les mostres sense tampó de càrrega, utilitzar-ho solament com a guia i, córrer el gel durant 2-3h a 250V, 12mA i 4W aproximadament.
6. Desmontar el gel i assecar-ho sobre paper de Whatman 3MM.
7. Exposar.
8. Revelar al cap de 12-48h.

8. ANÀLISI I EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES

8.1 Obtenció d'anticossos policlonals anti-S_A

Per poder obtenir anticossos policlonals contra la proteïna S_A es va contactar amb el servei de Síntesi de Pèptids de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona, per dissenyar un pèptid de la proteïna S_A amb unes característiques prou immunogèniques. Els aminoàcids escollits van ser NH₂-CGNFKGMKIKPGSMGK-COOH de la posició 380-395 de la proteïna.

Aquest pèptid es va utilitzar per immunitzar 2 conills mascles de la soca New Zealand (anomenats 261 i 262). Les immunitzacions es van produir els dies 0, 14 i 28 amb dosis de 200 µg del pèptid pS_A conjugat amb KLH (*keyhole limpet hemocyanin*). La immunització dels conills es va duu a terme en el Servei d'anticossos del CSIC.

L'antisèrum que conté l'anticòs contra el pèptid de la proteïna S_A es va testar mitjançant Western-blot.

8.2 Extracció de proteïna

Els teixits es poden processar immediatament un cop extrets o es poden congelar amb N₂ líquid i guardar a -80°C fins a la seva utilització. En el cas de voler obtenir extractes proteïcs a partir de cèl·lules en cultiu, que haurem crescut en plaques de 6 cm o 10 cm segons l'experiment realitzat, les recollirem amb un *scraper*, rasant-les en PBS 1X fred. Es guarda el pellet de cèl·lules a -20°C fins a la seva utilització.

Reactius:

- RIPA (1xPBS, 1%Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)
- Inhibidors de proteasas: Aprotinina (stock 1mg/mL)
Leupeptina (stock 5mg/mL)
PMSF (stock 200mM)
Na₂OV₄ (stock 250mM)

Procediment:

Teixit

1. Preparar el tampó RIPA suplementat amb els inhibidors de proteasas:
RIPA 500 µL/200mg teixit
Aprotinina 1/1000
Leupeptina 1/1000
PMSF 1/100
Na₂OV₄ 1/250
2. Homogenitzar el teixit en tampó RIPA suplementat amb inhibidors de proteasas utilitzant un homogenitzador d'èmbol (mantenir les mostres sempre en gel).
3. Passar l'homogenat a un *eppendorf*.
4. Passar varies vegades per xeringa d'insulina per acabar d'homogenitzar be l'extracte.
5. Incubar l'homogenat en gel, mínim 30 min.
6. Centrifugar 20 min a 15.000 rpm a 4°C.
7. Passar el sobrenedant (extracte final) a un tub *eppendorf*.
8. Valorar la concentració de proteïna amb el *kit Bio-Rad Dc Protein Assay* (BIO-RAD).
9. Aliquotar i guardar a -80°C.

Cèl·lules

1. Resuspendre el *pellet* de cèl·lules amb un volum adequat de RIPA suplementat amb inhibidors de proteasas (50-300 µL depenent del *pellet*); mantenir les mostres sempre en gel.
2. Homogenitzar amb xeringa d'insulina i incubar en gel mínim 30 min.
3. Centrifugar 20 min a 15.000 rpm a 4°C.
4. Passar el sobrenedant (extracte final) a un nou tub.
5. Valorar la concentració, aliquotar i guardar a -80°C.

8.3 SDS-PAGE d'una dimensió i Western-blot

És una tècnica que s'utilitza per identificar i localitzar proteïnes en base a la seva capacitat per unir-se a anticossos. En la immunoelectrotransferència o western blot, les proteïnes d'una mostra, primer es separen electroforèticament en gels de poliacrilamida (barreja d'acrilamida-bisacrilamida que formen xarxes complexes depenent de la relació d'una i l'altra) i SDS agent que desnaturalitza les proteïnes i que les hi confereix una densitat de càrrega global negativa; permetent així, separa-les principalment segons el seu pes molecular.

En un segon pas les proteïnes són transferides a una membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) o niló mitjançant una segona electroforesi realitzada en poc temps i a gran voltatge en direcció transversal a l'eix major del gel. D'aquesta manera les proteïnes queden adherides a la membrana exactament en la mateixa posició i ordre que ocupaven en el gel d'acrilamida. La presència de les proteïnes es revela amb anticossos específics de les proteïnes d'interès, i anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa o fosfatasa alcalina, anticossos biotinitats, etc.

SDS-PAGE d'una dimensió

Procediment:

1. Muntar els vidres de l'aparell Miniprotean III (BIO-RAD), s'utilitzaran separadors de 0.75, 1.0 i 1.5 mm segons el volum de mostra a carregar.
2. Abocar el gel separador preparat segons la taula 13.
3. Abocar el gel concentrador preparat segons la taula 14. Colocar la pinta i deixar polimeritzar.
4. Diluir les mostres en tampó de càrrega, bullir 5 min i mantenir en gel.
5. Muntar els gels en la cubeta, cobrir amb tampó d'electroforesi i carregar les mostres.
6. Còrrer a 20 mA / gel i amparatge constant durant 1 h o fins que surti el front.
7. Desmontar els gels; segons la necessitat, tenyir els gels en coomassie i assecar o transferir.

Taula 13. Volums necessaris per a la preparació del gel separador de dos mini gels de poliacrilamida

Gel Separador		
Components	Percentatge d'acrilamida	
	10%	12%
30% acril / 0.8% bisacri	5,0 mL	6,0 mL
4x Tris / SDS pH 8,8	3,75 mL	3,75 mL
H ₂ O	6,25 mL	5,25 mL
10% Persulfat amònic	0,05 mL	0,05 mL
TEMED	0,01 mL	0,01 mL

Gel Concentrador	
Components	Cantitat
30% acril / 0.8% bisacri	0,65 mL
4x Tris / SDS pH 6,8	1,25 mL
H ₂ O	3,05 mL
10% Persulfat amònic	0,025 mL
TEMED	0,01 mL

Taula 14. Volums necessaris per a la preparació del gel concentrador de dos mini gels de poliacrilamida

Western-blot**Procediment:**

1. Equilibrar els gels en tampó de transferència.
2. Activar la membrana de WESTRAN[®] PVDF (Schleicher & Schuell) submergint-la uns segons en metanol.
3. Equilibrar la membrana en tampó de transferència.
4. Muntar la transferència seguint les instruccions de l'aparell i transferir a 400 mA durant 90 min.
5. Desmuntar la transferència.
6. Bloquejar les membranes amb 5% de llet en pols descremada en 1XPBS, entre 1-18 h a RT.
7. Incubar amb l'anticòs primari, *o/n* a 4°C, diluït en 5% de llet / 1XPBS-T, segons la taula següent:
8. Rentar la membrana amb quantitat suficient de PBS-T durant 10 min, repetir fins a un total de 3 rentats.
9. Incubar amb anticòs secundari conjugat amb peroxidasa (*Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins* de DAKO) diluït 1: 5000 en PBS-T durant 1 h a RT.
10. Rentar la membrana amb quantitat suficient de PBS-T durant 10min, repetir fins a un total de 3 rentats.
11. Revelar amb ECL-Plus (AMERSHAM-PHARMACIA)
12. Exposar una pel·lícula autora-dioagràfica 15-60 min i revelar.

Anticòs	Dilució
α SA (261)	1/350
Rabbit- α CypA	1/5000

8.4 Producció de la proteïna de fusió S_A-FLAG

El sistema FLAG està basat en la producció de proteïnes de fusió que contenen un epítot FLAG. Es tracta d'un octapeptid hidrofílic, N-Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lyc-C, que ens permet, mitjançant anticossos específics anti-FLAG, detectar la proteïna de fusió mitjançant tècniques de Western-blot, immunocitoquímica o immunoprecipitació.

El cDNA de S_A es va amplificar per RT-PCR amb uns *primers* específics (veure taula 10) i després de comprovar la seva seqüència es va subclonar en el plàsmid pFLAG-CMV-5a, adjacent a la seqüència codificant FLAG en posició C-terminal, per a la posterior síntesi de la proteïna de fusió S_A-FLAG.

8.5 Immunoprecipitació de proteïnes de fusió amb Flag i Western-blot amb anticossos monoclonals anti-Flag**8.5.1. Immunoprecipitació**

Per a la tècnica d'immunoprecipitació s'ha utilitzat l'ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel de SIGMA, es tracta d'un anticòs IgG monoclonal murí purificat i conjugat covalentment a agarosa per enllaços amb hidrazida.

La proteïna de fusió s'unirà a l'anticòs anti-FLAG i podrà precipitar unida a l'agarosa mitjançant una simple centrifugació. L'elució de la proteïna es donarà per competició per la unió a l'anticòs anti-FLAG entre el pèptid FLAG i la proteïna.

Procediment:

1. Transfectar les cèl·lules amb el plàsmid pFLAG-S_A.
2. Recollir les cèl·lules 24-48 h post-transfecció rasant-les amb un *scraper* en TBS/Ca (25mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM CaCl) fred.
3. Centrifugar 1 min a màxima velocitat.
4. Descartar el sobrenedant. Es pot guardar el *pellet* de cèl·lules a -20°C fins a la seva utilització.
5. Resuspendre el *pellet* amb tampó de lisi (25mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1% Triton X-100), homogenitzar molt bé amb xeringa d'insulina.
6. Incubar en gel 30 min.
7. Centrifugar a 12.000 g, 10 min.
8. Transferir el sobrenedant a un altre tub, és l'extracte proteic.
9. Equilibrar l'ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel en TBS/Ca.
10. Afegir 40-70 µL del gel equilibrat a l'extracte proteic.
11. Incubar en rotor orbital a 4°C de 2 h *o/n*.
12. Rentar el gel amb TBS/Ca, tres vegades.
13. Resuspendre el gel amb un volum mínim (50-100 µL) que contingui 150 ng/µL (concentració final) de pèptid FLAG en TBS/Ca per eluir la proteïna.
14. Incubar 30 min a 4°C en agitació vigorosa.
15. Centrifugar i passar l'eluit a un altre tub.

8.5.2 Western-blot amb l'anticòs anti-FLAG

Per la detecció de la proteïna de fusió S_A-FLAG per la tècnica de Western-blot s'ha utilitzat l'anticòs ANTI-FLAG[®]M2 *Monoclonal Antibody* de la casa comercial SIGMA, es tracta d'anticòs monoclonals IgG aïllats de cèl·lules en cultiu murines que reconeixen l'octapèptid FLAG.

Procediment

1. Fer un SDS-PAGE carregant la proteïna de fusió S_A-FLAG (la concentració dependrà de l'experiment a realitzar) diluïda en tampó de càrrega.
2. Transferir el gel a membrana de niló.
3. Bloquejar la membrana amb 5% de llet en pols descremada en TBS/Ca, entre 1-18 h a RT.
4. Incubar amb l'anticòs primari anti-FLAG, a una concentració de 10 µg/uL en TBS/Ca durant 30 min.
5. Rentar la membrana tres vegades amb TBS/Ca durant 10 min.
6. Incubar la membrana amb l'anticòs secundari (*Peroxidase-conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins* de DAKO), dilució 1:5000 en TBS/Ca durant 30 min.
7. Rentar la membrana tres vegades amb TBS/Ca durant 10 min.
8. Revelar amb ECL-Plus (AMERSHAM-PHARMACIA).
9. Exposar una pel·lícula autoradiogràfica de 1-15 min i revelar.

8.6 Immunocitoquímica amb l'anticòs anti-FLAG

L'objectiu d'utilitzar aquesta tècnica és la localització cel·lular de la proteïna S_A . L'anticòs policlonal 261 no ens permet visualitzar la proteïna endògena per immunocitoquímica, així doncs s'ha d'expressar la proteïna S_A en cèl·lules de mamífer mitjançant transfecció transitòria utilitzant el constructe S_A -FLAG. La cua octapeptídica en posició C-terminal ens permet visualitzar la proteïna S_A utilitzant l'anticòs anti-FLAG.

Procediment:

1. Transfectar les cèl·lules sembrades en una placa de 6 cm.
2. Al dia següent tripsinitzar les cèl·lules transfectades.
3. Sembrar 25.000 cèl·lules transfectades per cercle de tefló que conté 300 μ L de medi; afegir a les cantonades de la placa de 15 cm una mica de PBS per simular una cambra humida i evitar que s'assequin els portaobjectes.
4. Deixar les cèl·lules a l'incubador de cèl·lules *o/n*.
5. Rentar els portaobjectes en TBS/Ca fred.
6. Fixar les cèl·lules amb acetona:metanol (1:1 v/v) fred (-20°C) durant 1 min.
7. Rentar 4 vegades amb TBS/Ca durant 2 min.
8. Afegir 30 μ L/cercle de 10 μ g/mL d'anticòs primari α -Flag en TBS/Ca. Incubar les cèl·lules amb l'anticòs en una cambra humida i fosca durant 1 h a RT.
9. Rentar les cèl·lules 5 vegades amb TBS/Ca durant 2 min.
10. Afegir 30 μ L/cercle de l'anticòs secundari diluït en TBS/Ca i incubar en cambra humida i fosca durant 1 h.
11. Rentar 5 vegades amb TBS/Ca.
12. Contra-tinció i Muntatge.

Ab secundari Fluorescent	Ab secundari conjugat amb peroxidasa
Goat anti-Mouse IgG conjugat amb FITC (SIGMA)	Rabbit anti-Mouse conjugat amb peroxidasa (DAKO)
Dilució 1/350	Dilució 1/200

Contra-tinció i muntatge

Per Fluorescència

- a) Equilibrar els portaobjectes amb 2X SSC.
- b) Diluir el Iodur de Propidi (1.5mM en DMSO) per tenyir els nuclis a 1/3000 en 2X SSC. Incubar les cèl·lules en IP durant 1-5 min.
- c) Pel muntatge s'utilitza el *SlowFade Light Antifade kit* (MOLECULAR PROBES).
 - 1) Afegir unes gotes de l'*Equilibration Buffer*, incubar 5-10 min.
 - 2) Treure el tampó i afegir 1 gota/cercle de *SlowFade Light*.
 - 3) Cobrir els portaobjectes amb els cubre-objectes amb compte de no deixar cap bombolla.
 - 4) Segellar-ho amb laca d'ungles.

Per microscòpia òptica

- a) Preparar al moment, per 1mL de DAB afegir 1 μ L de H₂O₂
- b) Repartir-ho per tots els cercles i incubar 5 min.
- c) Rentar amb TBS/Ca.

- d) Contra-tenyir els nuclis amb hematoxilina durant 1-2 min.
- e) Rentar amb H₂O de l'aixeta.
- f) Última rentada amb H₂O destil·lada.
- g) Muntatge amb AQUATEX (MERCK), tres gotes per portaobjectes i cubri-los amb els *covers* evitant les bombolles.
- h) No cal segellar-los.

8.7 Colocalització mitocondrial

Per visualitzar les mitocondries de les cèl·lules PCT3/PR10 s'ha utilitzat un marcador mitocondrial, el *MitoTracker Red*[®] *CM-H₂XRos* de la casa comercial MOLECULAR PROBES. Aquest compost és capaç d'atravesar les membranes mitocondrials i un cop dintre ser oxidat donant lloc a un catió fluorescent; a més és segrestat per proteïnes mitocondrials perquè pot formar enllaços tiols amb els pèptids, formant un conjugat aldèhid fixe.

Procediment:

1. Sembrar 25.000 cèl·lules/pou de tefló d'un portaobjectes estèril.
2. A les 24 h, afegir el marcador Mito Tracker a una concentració de 500 nM en el mateix medi de cultius.
3. Deixar les cèl·lules a l'incubador de cèl·lules durant 1 h i 30 min.
4. Fixar les cèl·lules per visualitzar-les al microscopi fluorescent o per fer immunocitoquímica

8.8 Marcatge metabòlic

L'anàlisi de la biosíntesi, processament, tràfic intracel·lular i degradació, generalment requereix que la proteïna a estudiar estigui marcada i es pugui immunoprecipitar a partir de l'extracte. El marcatge metabòlic consisteix en proporcionar a les cèl·lules un precursor marcat; en el nostre cas hem utilitzat una ³⁵S-Metionina i una ³⁵S-Cisteïna que s'afegeix en un medi de marcatge deficient en els aminoàcids metionina i cisteïna, de manera que aquest s'incorpora a les proteïnes durant la seva síntesi i mitjançant la seva pròpia maquinària biosintètica.

Procediment:

1. Sembrar les cèl·lules transfectades en plaques de 6 cm de diàmetre fins a un 90% de confluència.
2. Rentar les cèl·lules dues vegades amb medi de marcatge escalfat a 37°C.
3. Afegir 2,50 mL de medi de marcatge per placa i incubar 30 min a 37°C 5% CO₂ per tal de depleccionar les cèl·lules de metionina i cisteïna.
4. Preparar la solució de marcatge radioactiva diluint el *Tran-³⁵S-label*[™] (ICN Pharmaceuticals, Inc. Costa Mesa, CA-USA) a 0,1 mCi/mL en medi de marcatge.
5. Substituir el medi de les cèl·lules per 2,5 mL de solució de marcatge radioactiva i incubar durant 30 min a 37°C 5% CO₂.
6. Retirar el medi radioactiu, rentar amb medi fresc suplementat amb aminoàcids no marcats i recuperar les cèl·lules a diferents temps.

8.9 Traducció *in vitro* de cDNA's mitjançant lisats de reticulòcit

El procés de síntesi *in vitro* de proteïnes es pot dividir en tres etapes. Primer s'ha de subclonar el cDNA de la proteïna d'interès en un vector que contingui els promotors virals T7, T3 o SP6 per tal de dirigir la transcripció del cDNA. A partir d'aquest motlle es sintetitzarà els cRNAs, aquests podran ser traduïts a proteïna mitjançant un lisat de reticulòcit de conill que conté tota la maquinària necessària per realitzar la traducció i el còctel de metionina marcada amb ^{35}S . En cas de necessitar de modificacions post-traduccionals, s'ha utilitzat el complement de membranes microsomals pancreàtiques canines.

Reactius:

- Kit TNT [PROMEGA]
- Redivue L- ^{35}S]Metionina (300mCi/mmol) [ICN]
- RNasina [PROMEGA]
- Microsomes [PROMEGA]

Procediment:

1. Preparar la següent reacció:

Component	Quantitat
Lisat reticulòcit	12.5 μL
TNT [®] reaction buffer	1 μL
Barreja d'aa 1mM (-Met)	0.5 μL
RNasina (40U/ μL)	0.5 μL
TNT RNA polimerasa	0.5 μL
^{35}S]Metionina	5 μL
Motlle DNA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.5 μL
H ₂ O sense nucleases	fins a 25 μL
Canine microsomes	1.5 μL

2. Incubar 60 min a 30°C.

3. Analitzar 5 μL dels resultats de la traducció en un gel d'acrilamida SDS/PAGE.

4. Sucar el gel 5 min en la següent solució:

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

5. Assecar el gel sobre paper Whatman 3MM.

6. Exposar en un film fotogràfic i revelar al cap de 6-24 h.

8.10 Assaig de l'activitat enzimàtica, mesura de CO₂.

La finalitat d'aquest experiment és mesurar la incorporació del ^{14}C al CO₂ resultat del cicle de Krebs i per tant de l'oxidació d'un àcid gras marcat amb ^{14}C afegit al medi de cultiu cel·lular. En el nostre cas hem utilitzat l'àcid octanoic (^{14}C (1) àcid octanoic [AMERICA RADIOLABELED]). Les cèl·lules en cultiu utilitzen aquest substrate com a combustible metabòlic que necessàriament ha de ser oxidat en la mitocondria, figura 24B. EL $^{14}\text{CO}_2$ resultant de les reaccions metabòliques s'incorpora en un troç de paper de filtre que pot ser mesurat directament en un comptador de centelleig. En la figura 24A es representa d'una manera esquemàtica el procediment seguit en la mesura del CO₂.

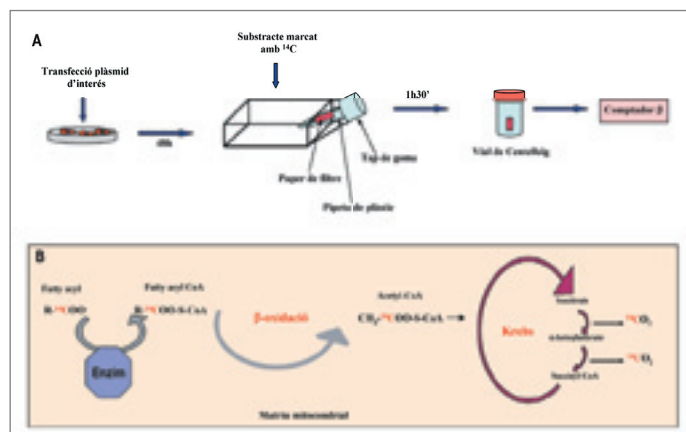


Fig.24. A. Protocol utilitzat en la mesura del CO_2 resultat de l'oxidació de l'àcid octanoic. B. Representació esquemàtica de la ruta metabòlica que segueix un àcid gras en la mitocondria.

Procediment:

1. Transfectar les cèl·lules sembrades en plaques de 6 cm amb el constructe S_A -FLAG o el vector FLAG buit.
2. Al dia següent tripsinitzar les cèl·lules i sembrar de 10^6 - 2×10^6 cèl·lules en flascons de cultiu T25.
3. A les 24h rentar les cèl·lules amb PBS 1X i afegir el substrate al medi de marcatge següent:

Per flascó T25:

100 μM	àcid octanoic no marcat [SIGMA]
2.8 μCi	^{14}C àcid octanoic [AMERICA RADIOLABELED]
2%	sèrum fetal
1X	Tampó Krebs-Ringer (10X) [NaCl, 1.37M; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12mM; KCl, 47mM; KH_2PO_4 , 12mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25mM]

H_2O fins a V_{final} de 6 mL

4. Tapar els flascons hermèticament amb taps de goma on hi haurem posat un tros de pipeta de plàstic amb un trocet de paper de filtre humitejat amb benzetònim [SIGMA]; veure figura 23A.
5. Incubar les cèl·lules a 37°C i 0.5% de CO_2 durant 1 h i 30 min.
6. Treure el paper de filtre amb compte de no tocar el medi de marcatge i ficar-ho en un tub de centelleig que tindrà 4 mL de líquid de centelleig.
7. Mesurar la radioactivitat en un comptador de centelleig.
8. Recollir les cèl·lules per fer una extracció protèica o de triglicèrids.

8.11 Extracció de triglicèrids

Procediment:

1. Resuspendre el pellet de cèl·lules recollides en l'apartat anterior amb 100 μL de tampó de lisi (1X PBS, 0.1% SDS, 0.1N NaOH).

2. Afegir 750 µL de solució DOLE: 1 volum d'heptà
4 volums d'alcohol isopropílic
0.1 volums de H₂SO₄ 1N
3. Passar pel *vortex* i reposar 5 min.
4. Afegir 750 µL d'heptà i repetir pas 3.
5. Recollir tota la fase orgànica (superior) i l'afegim directament en 4 mL de líquid de centelleig.
6. Comptar en comptador de centelleig.

Annex: composició de solucions i medis de cultius bacterians

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	137mM	Autoclavar
	KCl	2.5 mM	
	Na ₂ PO ₄	10 mM	
	KH ₂ PO ₂	1.4 mM	
Solució D	Tiocianat de Guanidini	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-lauril Sarcosina	0.5 % (v/v)	
SSC 20X	NaCl	3M	Ajustar el pH a 7.0 amb HCl. Autoclavar
	Citrat sòdic	0.3 M	
Tampó SM	Tris.HCl, pH 7.5	50 mM	Autoclavar i guardar en aliquotes de 10 mL
	NaCl	100 mM	
	MgSO ₄	8 mM	
	Gelatina	0.01 % (v/v)	
TE 1X	Tris.HCl, pH 8.0	10 mM	Autoclavar
	EDTA	1 mM	
TAE 1X	Tris base	40 mM	Ajustar el pH a 8.1 Autoclavar
	Àcid acètic	2 mM	
	EDTA	0.2 mM	
Medis de cultius bacterians			
Nom	Composició		Comentaris
MEDI LB (per 1L)	Triptona	10 g	Ajustar el pH a 7.5 amb NaOH. Autoclavar
	<i>Yeast extract</i>	10g	
	NaCl	5 g	
MEDI NZY	NZY (GIBCO)	15 g/L H ₂ O	Autoclavar
LB-agar (per 1L)	Triptona	10 g	Autoclavar i deixar soli- dificar
	<i>Yeast extract</i>	10g	
	NaCl	5 g	
	Agar	15 g	
Top-agar (per 100 mL)	Triptona	1 g	Ajustar el pH a 7.5 amb NaOH. Autoclavar
	<i>Yeast extract</i>	1 g	
	NaCl	0.5 g	
	Agarosa	0.7 g	