

# Relació estructura-funció en la família de transportadors d'aminoàcids heteromultimèrics. Identificació d'una nova família de transportadors lisosomals

Raúl Estévez Povedano

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

## **Materials i mètodes**

UNITAT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ EN LA FAMÍLIA DE  
TRANSPORTADORS D'AMINOÀCIDS HETEROMULTIMÈRICS  
IDENTIFICACIÓ D'UNA NOVA FAMÍLIA DE  
TRANSPORTADORS LISOSOMALS**

**RAÚL ESTÉVEZ POVEDANO**

Barcelona, desembre de 1999

## **Materials i mètodes**





# MATERIALS I MÈTODES

## 1. MANIPULACIÓ I/O DETECCIÓ DE PROTEÏNES

### 1.1 PURIFICACIÓ D'IgG A PARTIR DEL SÈRUM. CROMATOGRAFIA D'AFINITAT PER PROTEÏNA A L·LIGADA A SEFAROSA. (MÈTODE DE BAIXA SALINITAT)

El mètode utilitzat està fonamentat en el protocol proposat per Lane *et al.*, (1988). Mitjançant aquest mètode va purificar-se la fracció d'IgG que hi havia a l'antisèrum (sèrum procedent de les immunitzacions). Es basa en l'afinitat de la proteïna A per la fracció Fc de les IgG del conill.

#### 1.1.1 REACTIUS

- Aigua destil·lada
- PBS pH 7.4
- Proteïna A sefarosa CL-4B (Farmacia)
- Tampó Tris 10 mM, pH 8.0
- Tampó Tris 100 mM, pH 8.0
- Tampó Tris 1 M, pH 9.0
- Glicina 100 mM, pH 2.7
- 2 ml d'antisèrum MANRX
- 2 ml de sèrum preimmune (MANPRE)

#### 1.1.2 MATERIAL

- 2 columnes BioRad d'11 ml de capacitat (Polypropylene Econo-Column) amb 2ml de resina empaquetada (Proteïna A-Sefarosa). El rendiment d'unió va de 10 a 20 mg d'IgG/ml de resina empaquetada.
- Cubetes de quars.
- Espectrofotòmetre Shimadzu.
- Bosses de diàlisi (retenció de molècules amb pes molecular igual o superior a 12000 D, Sigma, núm. cat. D-9277) prèviament tractades (Lane *et al.*, 1988). Breument, se submergeix les bosses en una solució de 5 mM d'EDTA i 200 mM de NaHCO<sub>3</sub>, es bullen en aquesta solució durant 5 minuts. S'elimina aquesta solució i es renten les bosses amb aigua Milli-Q. Es repeteix aquest procés un cop. Finalment, després de l'últim rentatge de les bosses amb aigua Milli-Q, es llençava aquesta aigua i es col·locaven les bosses dins d'una ampolla autoclavable de coll ample que contenia aigua Milli-Q. Després d'autoclavar les bosses és preferible afegir azida sòdica fins a una concentració final del 0.02%.

#### 1.1.3 PROCEDIMENT

##### 1.1.3.a Preparació de les columnes

Tot el procés es va dur a terme a 4°C. Es van preparar dues columnes BioRad cadascuna amb 2ml de Proteïna A-Sefarosa empaquetada (aproximadament hi ha 10 mg d'IgG/ml d'antisèrum, i el rendiment d'unió és de 10-20 mg d'IgG/ml de gel). L'empaquetament de la resina es feia utilitzant aigua destil·lada. La columna es va

equilibrar amb tampó Tris 100 mM pH 8.0 mantenint un flux constant d'aquest tampó.

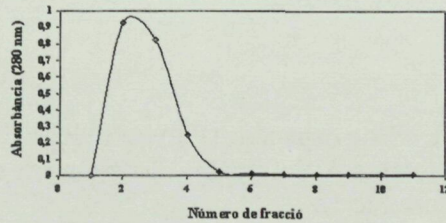
**1.1.3.b Preparació de les mostres**

El pH de les mostres MANPRE i MANRX es va ajustar a pH 8.5 amb Tris 1 M pH 9.0 i glicina 100 mM pH 2.7.

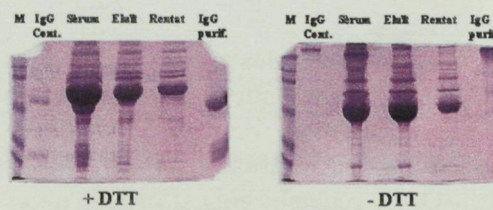
**1.1.3.c Cromatografia**

La mostra va passar-se tres vegades per la columna, després la columna va rentar-se amb 10 volums (2 ml de resina empaquetada \* 10 = 20 ml) de tampó Tris 100 mM, pH 8.0. Es va fer un segon rentatge de la columna amb 20 ml de tampó Tris 10 mM pH 8.0. L'elució de la columna es va dur a terme amb glicina 100 mM pH 2.7. Van recollir-se 10 fraccions de 500 µl de volum final en tubs eppendorf que contenien prèviament 25 µl de tampó Tris 1M pH 9.0, per tal de neutralitzar el pH de la mostra recollida. Es van fer dilucions 1/20 en PBS pH 7.4 de cadascuna de les fraccions, per tal d'identificar aquelles que contenien la major part de les IgG purificades, mitjançant la lectura de l'absorbància a 280 nm en cubetes de quars. Es va observar un únic pic d'absorbància comprès entre les fraccions núm. 4 i núm. 7. Es van barrejar les fraccions que constituïen el pic d'IgG per a cadascuna de les mostres inicials (MANPRE i MANRX) i va procedir-se a fer la diàlisi contra PBS pH 7.4 (1 litre) durant 16 hores a 4°C. Van recuperar-se els volums de sengles bosses i vam determinar la concentració de proteïnes mitjançant la lectura a 280 nm (1 unitat de densitat òptica correspon a 0.8 mg/ml de proteïna). La concentració d'IgG per a MANPRE va ser de 1.3 µg/µl, i per a MANRX de 7.2 µg/µl.

A)



B)



C)

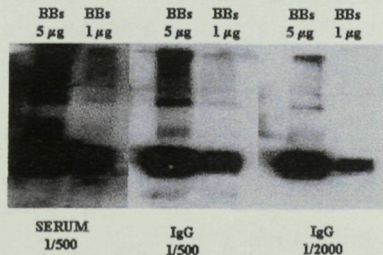


Figura 1. Experiment típic de purificació d'un anticòs. A) Perfil de la proteïna al eluir l'anticòs. B) Tinció per Coomassie-blue de diferents fraccions en presència o no d'agents reductors. C) Comprobació que l'anticòs purificat funciona en assaig de western blot.

### 1.1.3.d Comprobació

Per tal de comprovar la puresa de les IgG obtingudes va processar-se una petita quantitat d'aquestes (0.5 µl) per SDS-PAGE (10% d'acrilamida) en condicions no reductores i reductores. Després de la migració va tenyir-se el gel amb blau de Coomassie i van visualitzar-se les bandes. Si la fracció estigués enriquida en IgG de pes relativament homogeni, la tinció amb blau de Coomassie revelaria la presència d'una banda majoritària de 150 kD en condicions no reductores, així com de bandes de 55 i 20 kD corresponents a les cadenes pesades (H) i lleugeres (L) separades. I això va ser exactament el que vam observar. També s'ha de comprovar per mitjà d'un assaig de transferència Western que l'anticòs reconeix l'epítop. En la **figura 1** presento un experiment típic de purificació d'un anticòs (en concret MANR5).

## 1.2 UNIÓ D'IgG A BOLETES D'ACRILAMIDA

Com que no obteníem cap resultat positiu en immunoprecipitar rBAT a partir de membranes apicals de rata (vegeu protocols d'immunoprecipitació), vam decidir unir l'anticòs a boletes d'acrilamida. Com a control inespecífic també s'uneixen IgG no específiques. Es basa en l'acoblament de les proteïnes a un gel mitjançant un enllaç covalent *N*-alquil-carbamat entre el grup amina nucleòfil i la matriu del gel.

### 1.2.1 REACTIUS

- Tampó borat 0.1 M pH 8.5
- Reacti-Gel™ (GF-2000) (Pierce)
- Columna BioRad (igual que en l'apartat anterior)
- Tampó borat 0.1 M 0.9% NaCl pH 8.5.
- Tampó Tris 2 M pH 8.5
- Tampó Tris 50 mM pH 7.4

### 1.2.2 PROCEDIMENT

1. Posem al voltant de 2 mg d'IgG purificades amb el tampó borat sense NaCl. No fem servir mai tampons com ara Tris que tenen amines primàries, ja que s'acoblaríen al gel.
2. Afegim uns 3 ml de Reacti-Gel en la columna Bio-Rad que té acoblada una goma connectada al buit. Rentem 3 vegades amb 3 ml d'aigua bidestil·lada a 4°C per treure l'acetona. Rentem 3 vegades amb tampó borat 0.1 M amb NaCl.
3. Afegir la mostra. Tapem i ho deixem 48 h amb agitació a 4°C.
4. Rentem 3 vegades amb Tris 2 M pH 8.5, per bloquejar llocs inespecífics. Tornem a rentar amb Tris 50 mM pH 7.4.
5. Guardem les boletes en aigua destil·lada amb 0.02% d'azida sòdica a 4°C. Carreguem una part del primer sobrenedant després d'afegir la mostra i ho tenyim amb blau de Coomassie per comprovar que s'ha enganxat l'anticòs.

## 1.3 OBTENCIÓ DE PROTEÏNES DE MEMBRANES TOTALS A PARTIR DE TEIXITS DE RATA

El protocol utilitzat està basat en el descrit prèviament per Camps *et al.*, (1992).

### 1.3.1 REACTIUS

- Solució de pentobarbital sòdic (20 mg pentobarbital sòdic/ml de salí) en salí fisiològic (NaCl 0.9%).
- Salí fisiològic.
- Tampó d'homogeneïtzació pH 7.4: Hepes 25 mM, EDTA 4 mM, Aprotinina 1U/ml, Benzamidina 25 mM, PMSF 0.2 mM, leupeptina 1 µM, lepestatina A 1µM, sacarosa 250 mM. Es preparava just abans d'utilitzar-lo i es mantenia a 4°C durant tot el procés.

### 1.3.2 MATERIAL

- Material de cirurgia
- Tubs còrex de vidre de 30 ml
- Politró CPCU
- Tubs Beckman d'ultracentrifugació de 10.4 ml de capacitat
- Xeringues de plàstic d'1 ml 25-Gauge

### 1.3.3 PROCEDIMENT

1. Els animals utilitzats eren rates mascles de la soca Wistar, d'un pes comprès entre 200 i 250 g aproximadament. El sacrifici dels animals es va fer sempre anestesiant amb pentobarbital sòdic (5-7 mg/100g de pes corporal; 20 mg/ml de salí). Els teixits extrets van ser ronyó (total o escorça) com a control positiu de la presència de rBAT; cervell, cor i fetge, com a controls negatius. La sang continguda als teixits s'eliminava banyant els teixits extrets en salí fisiològic, aquells es congelaven en nitrogen líquid i posteriorment es guardaven a -80°C, fins a la seva utilització.
2. L'homogeneïtzació es duia a terme utilitzant l'aparell Politró CPCU (utilitzant la sonda d'1 cm de diàmetre) a intervals de 30 segons a 6 unitats de la seva escala, en tubs còrex de 30 ml, i s'homogeneïtzava cadascun dels teixits (0.5-1g de teixit) en 8 ml del tampó d'homogeneïtzació, mantenint els tubs en gel (0°C) durant el procés.
3. Els homogenats se sotmetien a una primera centrifugació (centrífuga Sorvall, rotor SA 600): ronyó, fetge, cor 10000 \* g, 10 min (4°C); cervell 5000 \* g, 5 min (4°C).
4. El sobrenedant es recull i es descarten els precipitats. El sobrenedant es transfereix a un tub d'ultracentrífuga i es centrifuga a 200000 \* g 1 h 30 min (alternativament, a 150000 \* g durant 2 hores) a 4°C (rotor T-875, Sorvall).
5. El sobrenedant es descarta i es resuspèn el precipitat (proteïnes de membranes totals) amb tampó d'homogeneïtzació (de 100 a 500 µl segons les dimensions del precipitat). La resuspensió s'aconsegueix utilitzant primer una pipeta automàtica P200, després una xeringa d'insulina a la qual s'ha substituït l'agulla per una punta de pipeta automàtica P200, i finalment, s'utilitza una agulla de 25 G. Tot el procés de resuspensió es dur a terme a 4°C.
6. Es fan parts que es mantenen a -20°C. La valoració de proteïnes es fa pel mètode de Bradford (vegeu més endavant).

## 1.4 OBTENCIÓ DE MEMBRANES APICALS DE L'ESCORÇA RENAL DE RATA

### 1.4.1 MÈTODE 1

El protocol utilitzat es basa en el descrit per Furlong *et al.*, (1990).

#### 1.4.1.a Reactius

- Tampó d'homogeneïtzació: 50 mM de manitol; 2 mM de Tris-HCl, pH 7.1.
- MgCl<sub>2</sub> 1 M
- 100 mM de manitol; Tris-HCl 12 mM pH 7.4

#### 1.4.1.b Procediment

1. 1 g de teixit renal s'homogeneïtza en 40 ml de tampó d'homogeneïtzació. Es fan 5 passades amb una sonda d'ajust lax, seguides per 5 passades amb la sonda ajustada.
2. S'afegeix MgCl<sub>2</sub> fins a concentració final de 12 mM. L'homogenat s'agita suaument durant 15 minuts i se centrifuga a 3000 \* g durant 15 minuts a 4°C. El sobrenedant es centrifuga durant 25 minuts a 39500 \* g a 4°C.
3. El precipitat obtingut es resuspèn en 20 ml del tampó inicial i es rehomogeneïtza amb 5 passades de la sonda ajustada.
4. Es torna a afegir MgCl<sub>2</sub> a una concentració final de 12 mM, i es torna a repetir el procés a partir del qual s'obtenen membranes d'epiteli en raspall. El precipitat final es resuspèn amb l'ajut d'una xeringa amb punxa de 25 G en 400 µl del tampó 100 mM de manitol; Tris-HCl 12 mM pH 7.4. Es fan part alíquotas i es guarden a -20°C. La qualitat de la mostra així obtinguda es mesura per activitat enzimàtica de la fosfatasa alcalina (Bretaudiere i Spillman *et al.*, 1984). La valoració de proteïnes es fa pel mètode de Bradford *et al.*, (1976)

Nota: En aquest cas, a causa de l'extracció macroscòpica del teixit, el que en aquest apartat s'anomena imprecisament *escorça renal* es refereix a tot allò que no és la papil·la, o sigui, que inclou la medul·la externa.

### 1.4.2 MÈTODE 2

El protocol utilitzat es basa en el descrit per Malathi *et al.*, (1979). Era necessari posar a punt un altre protocol per obtenir membranes apicals per obtenir preparacions on la quantitat de complex rBAT i la subunitat lleugera representes el 100% de la preparació. Així, es van seguir les recomanacions del treball publicat per Wang *et al.*, (1995).

#### 1.4.2.a Reactius

- Tampó d'homogeneïtzació: 50 mM de manitol; 2 mM de Tris-HCl, pH 7.0.
- CaCl<sub>2</sub> 1 M
- NEM 5 mM

#### 1.4.2.b Procediment

1. Al voltant d'un gram de teixit renal s'homogenitza en 30 volums (pes/volums) del tampó d'homogeneïtzació amb NEM 5 mM, prèviament refredat durant 5 minuts en un Sorvall Omnimixer.



2. S'afegeix solució de 1 M CaCl<sub>2</sub> a l'homogenat fins que la concentració es de 10 mM. La barreja s'agita en un agitador orbital durant 10 minuts.
3. Aquest homogenat es centrifuga durant 15 minuts a 3600 rpm (3000g) en la centrifuga Sorvall RC-3B. Es descarta ara el pellet d'aquesta centrifugació.
4. El sobrenadant es centrifuga durant 27 minuts a 16000 rpm (40000 g). El pellet representa la membrana apical. Es resuspen en el mateix volum del mateix tampó emprant una xeringa d'un mil·lilitre amb una agulla de 25 gauges.
6. Es centrifuga una altra vegada a la mateixa velocitat. Ara es resuspen el pellet un altre cop amb la mateixa xeringa fent servir el tampó d'homogeneïtzació però sense afegir NEM.

## 1.5 OBTENCIÓ DE MEMBRANES TOTALS D'OÒCITS.

### 1.5.1 MÈTODE 1

Aquest mètode està extret de Hagenbuch *et al.*, (1991).

S'afegeix a 15-20 oòcits 200 µl de solució d'homogeneïtzació (0.25 de M sacarosa, 1 mM de PMSF i 1 mg/ml de leupeptina). Els oòcits s'homogenitzen passant-los repetidament per una agulla de 25 gauges. L'homogenat es centrifuga a 100000 g durant 15 min a 4°C i el precipitat es resuspèn en 7.5 ml de 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Després de 30 min en gel, les mostres novament es centrifuguen a 100000 g durant 1 h a 4°C, i el precipitat es resuspèn en la solució d'homogeneïtzació (125 µl/20 oòcits). S'utilitzen parts alíquotes per valorar proteïnes i per mesurar radiactivitat.

### 1.5.2 MÈTODE 2

Aquest mètode està extret de Thomas *et al.*, (1993).

30-50 oòcits s'homogeneïtzen en 10 µl/oòcit de tampó A (250 mM de sacarosa, 1 mM d'EDTA, 10 mM de Tris pH 7.5, més 5 mg/ml de leupeptina i pepstatina, i 1 mM de PMSF) mitjançant 20 passades amb un homogeneïtzador de vidre-tefló de mida eppendorf. L'homogenat es centrifuga 2 cops a 1000 g durant 10 min a 4°C per eliminar el vitel, i el sobrenadant es precipita per centrifugació a 100000 g durant 90 min a 4°C i es resuspèn en 2 ml/oòcit del tampó A. Les membranes s'emmagatzemen a -20°C.

## 1.6 DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES.

### 1.6.1 MÈTODE DE BRADFORD

La valoració de proteïnes es fa d'acord amb el mètode de Bradford *et al.*, (1976), utilitzant el reactiu *BioRad Protein Assay* de *BioRad*. Aquest mètode es basa en el canvi del pic d'absorbància en una solució àcida de blau brillant Coomassie G-250, quan aquest es lliga a proteïnes. El canvi del màxim d'absorbància és de 465 a 595 nm.

#### 1.6.1.a Reactius

- Solució comercial *BioRad Protein Assay* (blau brillant de Coomassie, àcid fosfòric i metanol) diluïda 1/5 amb aigua destil·lada i filtrada.

- Solució d'estoc de  $\gamma$ -globulines bovines (1 mg/ml) en tampó fosfat pH 7.4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM), conservada a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 1.6.1.b Material

- Cubetes de plàstic d'1.5 ml de capacitat  
- Espectrofotòmetre Shimadzu

### 1.6.1.c Procediment

1. Les part alíquotas de les mostres a valorar es mantenen en gel un cop descongelades. En cas necessari es fan dilucions amb aigua destil·lada (1/200 per al fetge i al cor, i 1/100 per al cervell). La mostra procedent de cèl·lules (d'1 a 5  $\mu\text{l}$ ) s'afegeix directament (sense diluir) a la cubeta corresponent.
2. Es prepara la quantitat necessària de reactiu *BioRad* diluït, tenint en compte que es necessiten 1.3 ml per cubeta. La patró comprèn de 0 a 20  $\mu\text{g}$ .
3. En les cubetes de l'espectrofotòmetre es dipositen de 5 a 20  $\mu\text{l}$  de les mostres diluïdes, o 1 o 5  $\mu\text{l}$  de les preparacions sense diluir. Per al patró es dipositen els volums corresponents.
4. S'afegeix a les cubetes 1.3 ml de reactiu *BioRad* diluït. S'agiten per inversió i després de 5 a 10 minuts d'incubació amb el reactiu es procedeix a la lectura de l'absorbància a 595 nm.

### 1.6.2 MÈTODE DE BCA

En el cas de que la mostra contingui detergents (per exemple, 1% de TX-100), el mètode de Bradford pot donar resultats erronis. Fem servir llavor el mètode BCA (*Protein Assay Reagent*, 23225) seguint les especificacions del fabricant (Pierce). La lectura de l'absorbància es realitza a 562 nm. Es basa en el fet que les proteïnes reaccionen amb Cu(II) formant Cu(I), el qual reacciona amb BCA per formar un compost que té color púrpura. Es fa servir com a estàndard l'albumina i no les  $\gamma$ -globulines. No són compatibles mostres que continguin 100 mM d'EDTA, 1 mM de DTT i 20% de sulfat amònic.

## 1.7 ELECTROFORESI SDS-PAGE

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (PAGE/SDS) és el sistema més clàssic per separar proteïnes en funció de la seva mida (Laemli, 1970). El tampó de càrrega (*Laemli Sample Buffer* o LSB) conté SDS, el qual confereix càrrega negativa a les proteïnes, mantenint alhora la relació càrrega/massa constant. Quan la barreja de proteïnes així tractades se sotmet a un camp elèctric establert sobre una malla d'un polímer acrilamida-bisacrilamida, aquestes es resoldran en funció de la seva mida. En aquest tipus d'electroforesi es preparen dos tipus de gels en funció de la seva concentració d'acrilamida: el gel concentrador i el gel separador o de migració. El gel concentrador, en el nostre cas té un 3.3% d'acrilamida, té com a funció alinear les proteïnes davant de l'inici del gel separador. El gel separador, en el nostre cas d'un 7.5% o 6.5% d'acrilamida, separa les proteïnes segons la seva mida. Paral·lelament a les mostres es fan migrar estàndards de pes molecular i també s'utilitza fumarasa pretenyida, la qual permetia visualitzar *grosso modo* la qualitat de la transferència i facilitava situar els carrils que contenien els pesos moleculars, per tal de poder-los tallar abans d'iniciar el blocatge.



Hem utilitzat aquest tipus d'assaig per separar segons la seva mida les proteïnes de membranes totals o fraccions de membranes. Després de l'electroforesi aquestes proteïnes s'electrotransferien a una membrana de nilón, per a la posterior realització de l'immunotransferència. S'han realitzat dos tipus de tractament de les mostres: condicions no reductores (les mostres es preparen normalment amb LSB) i condicions reductores (les mostres són tractades amb 100 mM de DTT, a més a més de l'LSB).

### 1.7.1 REACTIUS

- Tampó d'electroforesi x10: Tris-Base 250 mM, glicina 1.91 M, SDS 1%.
- Tampó de càrrega de les mostres LSBx3 (la solució mare està concentrada tres vegades, pot conservar-se a temperatura ambient o -20°C): per 20 ml: Tris 1.5 M, pH 6.8 (4 ml); Glicerol (12 ml); SDS 30% (4 ml); Blau de Bromofenol (un pessic).
- Gel separador: acrilamida 7.5% o 6.5% (depenent dels casos); bisacrilamida 0.27%; Tris-Base pH 8.8, 0.375 M; persulfat d'amoni 0.043%; TEMED 2.2 mM. Els volums preparats variaven segons el sistema d'electroforesi utilitzat: 30 ml si es tractava del sistema HSI; 4 ml si es tractava del sistema Mini-Protean.
- Gel concentrador: acrilamida 3.3%; bisacrilamida 0.088%; Tris pH 6.8 0.125M; SDS 0.1%; persulfat d'amoni 0.1%; TEMED 6.6 mM. Els volums preparats eren 10 ml per al sistema HSI; 2 ml per al Mini-Protean.
- Estàndards de pes molecular: es dissolien en LSB x1 a 4°C. *Broad range molecular weight markers, BioRad* (núm. cat. 161-0317). Es diluïen segons les instruccions del fabricant. Es conserven alíquotes a -20°C. Els marcadors continguts en aquest estàndard són: miosina, 200 kD;  $\beta$ -galactosidasa d'*E.coli*, 116.5 kD; fosforilasa B de múscul de conill, 97.4 kD; BSA, 66.2 kD; ovoalbúmina de clara d'ou de gallina, 45 kD; anhidrasa carbònica bovina, 31 kD; inhibidor de tripsina de soja, 21.5 kD i liozima de clara d'ou de gallina, 14.4 kD. Els estàndards de pesos moleculars pretenyits (*BioRad* núm. cat. 161-0318) són: miosina, 213 kD;  $\beta$ -galactosidasa, 123 kD; BSA, 85 kD; ovoalbúmina 50.3 kD; anhidrasa carbònica, 33.3 kD; inhibidor de tripsina de soja, 28.5 kD; liozima, 18.9 kD; aprotinina, 7.8 kD.
- Fumarasa pretenyida: es preparava en LSB x1 al 0.02% (fumarasa pretenyida Sigma). Es fan part alíquotas i es conserven a -20°C.
- DTT 2 M en aigua destil·lada. Es conserva a -20°C.
- Etanol.

### 1.7.2 MATERIAL

- Preparacions de proteïnes de membranes totals
- Sistema HSI o Mini-Protean (BioRad)
- Fonts de corrent elèctric
- Pipeta Hamilton de 100  $\mu$ l
- Bany sec Selecta TermBloc

### 1.7.3 PROCEDIMENT

#### 1.7.3.a Preparació de les mostres

En un tub eppendorf es diposita la quantitat de proteïnes desitjada (per al sistema HSI entre 50 i 700  $\mu$ g de proteïna; per al sistema Mini-Protean entre 1 i 100  $\mu$ g), tenint en compte que el volum dels pous d'1.5 mm de gruix és de 150  $\mu$ l per al sistema HSI; i

pels pous de 0.75 mm de gruix és de 27 µl per al sistema Mini-Protean). S'afegeix LSBx3 i aigua destil·lada fins que la concentració de l'LSB sigui 1X. Quan les mostres es tracten amb DTT, aquest s'afegeix sobre la mostra amb LSB, de forma que la concentració final sigui de 100 mM de DTT. Es barreja el conjunt lleugerament i es centrifuguen breument els tubs (12000 \* g durant 30 segons en una microfuga de sobretaula). Finalment es bullen a 95°C durant 5 minuts, es tornen a centrifugar (12000 x g durant 30 segons), i es carreguen al sistema d'electroforesi.

### 1.7.3.b Polimerització dels gels

Prèviament al muntatge del sistema d'electroforesi, es netegen amb etanol els accessoris o peces que han de contactar directament amb les proteïnes. El muntatge del sistema es fa d'acord amb les instruccions del fabricant. Un cop muntat el sistema es marca per la part externa d'un dels vidres el nivell que ha d'assolir el gel separador. El reactiu TEMED és l'últim que s'afegeix a la solució polimeritzadora del gel separador, es barreja lleugerament i es diposita lentament entre els dos vidres del sistema sense formar bombolles. Després es diposita a sobre, sense formar turbulències, una capa d'aigua destil·lada com a aïllador per a la polimerització. Una vegada el gel separador ha polimeritzat, es decanta la capa d'aigua superior i es diposita la solució polimeritzadora del gel concentrador. Ràpidament es col·loca la pinta fins que el gel concentrador hagi polimeritzat. S'omple la cubeta de tampó d'electroforesi 1x. Es col·loquen els vidres amb el gel polimeritzat dins de la cubeta i es treuen les bombolles d'aire que hagin pogut quedar entre els vidres i la cubeta amb l'ajut d'una pipeta Pasteur.

### 1.7.3.c Migració del gel

Es treuen les pintes d'ambdós sistemes i s'omplen els pous amb tampó d'electroforesi 1x abans de carregar les mostres. La càrrega de les mostres es fa amb una pipeta Hamilton (25-100 µl). Per al sistema HSI es col·loca la cubeta superior i s'omple de tampó d'electroforesi 1x. Es tanca el circuit i es connecta a una font d'alimentació a 10 mA/gel (amperatge fix, voltatge no limitant). La migració dura unes 14 hores. Per al sistema Mini-Protean es tanca el circuit i es connecta a 200 V durant 1 hora (amperatge no limitant). La migració de les proteïnes és del pol negatiu al pol positiu.

## 1.8 ASSAIG TIPUS TRANSFERÈNCIA WESTERN

### 1.8.1 ELECTROTRANSFERÈNCIA DE LES PROTEÏNES CONTINGUDES AL GEL

Per poder realitzar l'immunotransferència és necessària la transferència de les proteïnes resoltes al gel separador cap a una membrana de nilón, de forma que quedin immobilitzades per adsorció. Un cop transferides les proteïnes, aquesta membrana o filtre és sotmès a la incubació amb l'anticòs primari anti-rBAT (MANRX) i la seva presència es revela posteriorment mitjançant la incubació amb proteïna A marcada radioactivament amb <sup>125</sup>Iode o per quimioluminiscència.

#### 1.8.1.a Reactius

- Tampó de transferència pH 8.3 (Tris-Base, 25 mM; glicina, 192 mM, metanol 20 % (v/v)).
- Tampó de muntatge pH 8.3 (es tracta del mateix tampó de transferència)

- Metanol
- Aigua destil·lada

#### **1.8.1.b Material**

- Sistema HSI. Cubeta o tanc de transferència BioRad (TransBlot Cell), amb els cassets de transferència corresponents. Sistema Mini-Protean. Cubeta de transferència Mini-Protean II, amb els cassets de transferència corresponents.
- 2 fregalls per gel que s'hagi de transferir.
- 2 rectangles de paper Whatmann 3MM Chr. per cada gel, de la mateixa mida del gel separador.
- 1 rectangle de la mateixa mida que el gel separador d'Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore), que és la membrana de transferència utilitzada (es tracta d'un difluorur de polivinilidè (PVDF), fortament hidrofòbic i més resistent que la nitrocel·lulosa al procés de manipulació).

#### **1.8.1.c Procediment**

Durant tot el procés la manipulació es fa amb guants.

1. La membrana se submergeix en una safata amb metanol durant 5 o 10 minuts i després se submergeix en aigua destil·lada també durant 5 o 10 minuts i finalment, en tampó de muntatge.
2. Els cassets de transferència se submergeix en tampó de muntatge, s'obren i es posa la cara fosca al fons, a continuació sobre la cara fosca del casset es posa un fregall, un paper Whatmann, el gel separador (s'ha tret prèviament el gel concentrador), la membrana de nilón, l'altre paper Whatmann, el segon fregall i es tanca el casset. S'ha de tenir cura que no quedin bombolles entre les diferents capes formades. El casset així muntat es diposita en el tanc de transferència corresponent, tenint en compte que la cara fosca ha de coincidir amb el pol negatiu, origen de la migració. En el cas del sistema HSI es fixa l'amperatge a 250 mA durant 3 hores 30 minuts. En el cas del sistema Mini-Protean, la transferència dura 1 hora a 250 mA, incorporant un sistema de refrigeració.

### **1.8.2 ASSAIG DE TRANSFERÈNCIA**

Aquesta fase de la transferència Western consta de quatre etapes: a) Bloatge de la membrana; b) Tinció del gel; c) incubació amb l'anticòs primari, i d) incubació amb proteïna-A marcada amb  $^{125}\text{I}$  o un anticòs secundari marcat amb peroxidasa. Ens referim a continuació a les condicions de treball establertes per a MANRX i per a MANPRE.

#### **1.8.2.a Bloatge de la membrana**

Per tal d'evitar al màxim la unió inespecífica d'anticossos a la membrana es preincuba el filtre d'immobilon que conté les proteïnes electrotransferides amb una solució rica en proteïnes (llet en el nostre cas) perquè s'uneixin inespecíficament als possibles llocs d'unió inespecífica que puguin haver-hi al filtre. A més a més, les posteriors incubacions amb l'anticòs primari i amb la proteïna A radioactiva es fan en solucions que també contenen llet, de forma que s'estableixi una certa competència entre ambdós tipus de proteïnes per les interaccions inespecífiques, (llet-inespecífiques i anticossos o proteïna A-específiques), i només tinguin lloc d'una manera estable per part dels anticossos i proteïna A les interaccions més específiques i afins.

**- REACTIUS**

- Solució de blocatge: 5% de llet descremada en pols Sveltesse (Molico, Nestlé), 0.02% d'azida sòdica en PBS, pH 7.4.

**- PROCEDIMENT**

1. Es desmonta la transferència i es retallen els carrils corresponents als pesos moleculars guiant-nos per la fumarasa. La membrana s'incuba durant 1 hora a 37°C amb agitació suau en la solució de blocatge (200 ml per a membranes del sistema HSI; 100 ml per a membranes del sistema Mini-Protean).

**1.8.2.b Tinció del gel**

Els gels que han sofert l'electrotransferència es tenyeixen per tenir una valoració visual de les proteïnes que romanen al gel, per mostrar així la qualitat de la transferència i detectar errors greus de càrrega de les mostres abans d'electroforesi.

**- REACTIUS**

· Solució per a la tinció de gels (blau de Coomassie): àcid acètic, 7.5% (v/v); isopropanol 25% (v/v); 0.05% (w/v) Brilliant Blue R (Sigma).

· Solució per a la tinció d'immobilon: metanol, 50% (v/v), àcid acètic, 10% (v/v); Brilliant Blue R 0.06% (w/v).

· Solució destenyidora de gels: àcid acètic 7.5% (v/v), isopropanol 7.5% (v/v). Alternativament la destinció dels gels pot efectuar-se amb aigua destil·lada calenta (al microones).

· Solució destenyidora de l'immobilon: metanol, 50% (v/v); acètic 10% (v/v).

**- MATERIAL**

· Paper Whatmann núm. 3MM Chr.

· Plàstic extensible d'ús domèstic Glad

· Assecador de gels BioRad

**- PROCEDIMENT**

1. Se submergeixn els gels i immobilons amb estàndards de pesos moleculars dins de la solució tenyidora corresponent, es deixen amb agitació de 4 a 5 hores a temperatura ambient, o bé 1 hora a 37°C.

2. El destenyiment es fa en les solucions corresponents durant intervals de temps semblants.

3. Les membranes destenyides es deixen assecar a temperatura ambient. El gel destenyit es col·loca sobre un rectangle de paper Whatmann, es cobreix el conjunt amb plàstic Glad. L'aparell assecador de gels es connecta a la bomba de buit i se seleccionen les condicions del cicle superior: 80°C durant 2 hores.

**1.8.2.c Incubació amb l'anticòs primari**

En el nostre cas els anticossos que hem utilitzat són l'antisèrum MANRX contra rBAT de conill, rata i rBAT humana (vegeu apartat 1) i el sèrum MANPRE (obtinguts al nostre laboratori).

**- REACTIUS**

· Solució d'incubació de l'anticòs primari: llet descremada a l'1%, 0.004% d'azida sòdica, en PBS pH 7.4.

- Anticòs primari: MANRX 1/500 o 1/400 en solució d'incubació del primari (10 ml per a una membrana procedent del sistema HSI; 5 ml per a una membrana procedent del sistema Mini-Protean). MANPRE es prepara a la mateixa dilució que MANRX.
- Tampó de rentatge: 0.01% de Tritó X 100, 0.02% d'azida sòdica en PBS pH 7.4.

**- PROCEDIMENT**

1. La incubació amb MANRX 1/400 es du a terme en una bossa de plàstic segellada que conté la membrana blocada i la solució d'incubació de l'anticòs primari. La incubació es fa a temperatura ambient amb agitació durant unes 16 hores.
2. Per tal de treure l'excés d'anticòs primari de sobre la superfície de la membrana i eliminar les interaccions inespecífiques es fan rentatges amb una solució que conté Tritó X-100 com a detergent.
3. Es recupera l'anticòs primari i es guarda a -20°C. Es reutilitza un màxim de 5 vegades. Es fan quatre rentats amb tampó de rentatge (150 ml sistema HSI; 100 ml sistema Mini-Protean) de 10 minuts cadascun a 37°C amb agitació.

**1.8.2.d Incubació amb <sup>125</sup>I-Proteïna A o anticòs secundari**

En el cas de la proteïna A, a causa de la naturalesa radioactiva del producte s'han d'extremar les precaucions treballant darrere d'una pantalla que protegeixi de les radiacions gamma emeses.

**- REACTIUS**

- Solució d'incubació de la proteïna A: 1% de llet descremada Sveltesse, 0.004% d'azida sòdica, en PBS pH 7.4.
- Solució comercial de <sup>125</sup>I-proteïna A radioactiva (1 µCi/µl, ICN; 100 µCi, núm. cat. 68038, activitat específica superior a 30 µCi/µg).

**- PROCEDIMENT**

Després dels rentatges del l'anticòs primari, les membranes s'incuben a temperatura ambient durant 3-4 hores amb agitació amb la solució d'incubació de la proteïna A, que conté 10<sup>5</sup> cpm/ml. Aquesta incubació es fa amb doble bossa i darrere de pantalles protectores de la radiació gamma emesa.

**1.8.2.e Rentats de la <sup>125</sup>I-Proteïna A. Autorradiografia**

Les condicions dels rentatges són les mateixes que per a l'anticòs primari. La solució radioactiva es recupera de la bossa i s'elimina com a deixalla radioactiva de <sup>125</sup>I.

**- MATERIAL**

- Paper Whatmann núm. 3MM Chr.
- Plàstic Glad o bossa de plàstic fi
- Pantalles d'exposició Curix Blue C2 Agfa
- Casset d'exposició Gevamat Casette, Agfa Gevaert 18 \* 24
- Films d'alta sensibilitat X-OMAT AR, Kodak. Films normals CURRIX RP2, Agfa.

La membrana, un cop rentada, es deixava assecar sobre paper de filtre a temperatura ambient. Un cop seca es fixava amb cinta adhesiva sobre paper Whatmann 3MM Chr. Es recobria amb plàstic Glad i s'exposava a -80°C.

**1.8.2.f Revelatge mitjançant ECL (Amersham)**

Una alternativa a la proteïna A és aquest mètode de luminescència. Pot ser més sensible, però pot donar més bandes inespecífiques. És important fer diverses dilucions de l'anticòs secundari. El revelatge es fa seguint les indicacions del



fabricant. Cal tenir en compte que no es pot afegir azida a cap solució ja que inhibeix la reacció.

### 1.8.3 ASSAIG *DOT-BLOT*

Vam fer servir aquest tipus d'assaig per a l'anàlisi de les fraccions que obteníem en les diferents columnes. Consistia a agafar un determinat volum de cada fracció i s'afegia sobre una membrana de nitrocel·lulosa (Schleicher & Schuell). Posteriorment, aquesta membrana es va processar de la mateixa forma que s'ha descrit en l'apartat "assaig d'immunotransferència". Presento un exemple típic al analitzar diferents fraccions.

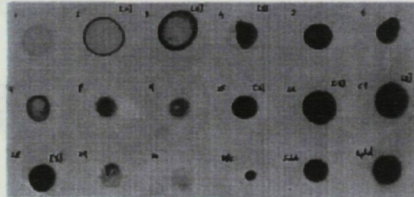


Figura 2. Exemple típic de *dot-blot* en analitzar diferents fraccions d'un cromatograma.

## 1.9 IMMUNOPRECIPITACIÓ

Bàsicament la immunoprecipitació consisteix a precipitar un antigen mitjançant un anticòs contra aquest, el qual s'acobra a una resina de forma directa: unió a boletes d'acrilamida (descriu anteriorment) o de forma indirecta (boletes que tenen acoplat un altre anticòs que reconeix la cadena pesada del nostre). En aquest segon cas, primer es pot incubar l'anticòs amb la mostra i després l'immunocomplex amb la resina, o primer l'anticòs amb la resina i després amb la mostra. La separació de la mostra no immunoprecipitada es fa mitjançant centrifugació si es fa en tubs després d'una sèrie de rentatges o en columna en agafar diferents fraccions.

Si la mostra no està solubilitzada (veure més endavant) es parla d'immunoabsorció. Si la mostra està solubilitzada es parla d'immunoprecipitació. Segons com sigui la solubilització podem considerar que sigui o no desnaturalitzant. En la desnaturalitzant la mostra s'incuba amb SDS en un tampó, es bull per trencar interaccions no covalents, després es dilueix la mostra per no trencar l'anticòs en incubar-se posteriorment. En la no-desnaturalitzant es fan servir detergents que, en principi, mantindran les seves estructures. És comú, en un principi, fer servir barreges de detergents com IMMUNOMIX, RIPA, etc. Després d'un temps d'incubació de la mostra amb l'anticòs, se centrifuga a velocitat baixa i es treu el material (sobrenedant) per sobre de les boletes (pellet). El pellet es renta amb tampó, que pot contenir sals per trencar interaccions no específiques (per exemple, KCl). Després s'elueix amb LSB a 95°C durant 5 minuts.

No hem tingut mai resultats positius en intentar immunoprecipitar la proteïna rBAT amb l'anticòs de que disposàvem fent moltes de les combinacions que he comentat. A títol d'exemple ensenyo una immunoprecipitació amb boletes d'acrilamida que tenen acoblat l'anticòs MANR5 on les mostres s'han solubilitzat amb immunomix. El grau d'immunoprecipitació és d'un 2%.



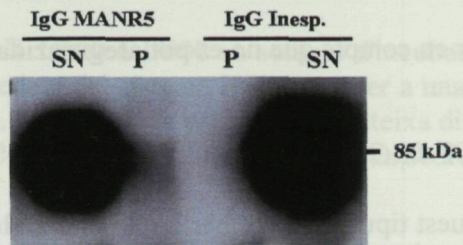


Figura 3. Exemple d'immunoprecipitació fent servir boletes d'acrilamida.

## 1.10 TRACTAMENT AMB ENDOGLICOSIDASA F I H

### 1.10.1 ENDOGLICOSIDASA F

L'endoglicosidasa F és un enzim que talla l'enllaç entre el primer i el segon residu de la cadena de carbohidrats (*N*-acetilglucosamina), i això permet veure si una proteïna presenta o no glúcids.

100 µg de membranes totals d'oòcits es desnaturalitzen afegint SDS a una concentració final de l'1% en un volum final d'uns 5 µl i bullint durant 4 minuts. S'afegeix després 25 µl de tampó fosfat (preparat a partir de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 M, i NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 M, en relació 4:1 a un pH de 7.3), 12.5 µl d'EDTA, 200 mM, 2.5 µl de TX-100 10% (concentració final 10 vegades superior a la de l'SDS, per tal que l'SDS no inactivi a la glicosidasa) i 2.5 µl d'una barreja d'inhibidors de proteases (pepstatina A, leupeptina, aprotinina, PMSF). S'afegeixen 0.5 U d'endoglicosidasa F i s'incuba durant 16 h a 37°C. Es para la reacció afegint 25 µl de LSBx3 i es bullen les mostres durant 10 minuts.

### 1.10.2 ENDOGLICOSIDASA H

Aquest assaig permet estudiar si la proteïna que estem estudiant ha passat o no el reticle endoplasmàtic. Així, si la proteïna és sensible a l'acció d'aquesta endoglicosidasa, no ha sofert les modificacions posttraduccionals que es produeixen en sortir del reticle. Aquests estudis es van realitzar amb membranes totals d'oòcits.

50-100 µg de proteïnes de membranes totals d'oòcits obtingudes es desnaturalitzen bullint-les 5 min en presència de 100 mM de DTT i 0.54% SDS. Després s'incuben en un tampó sodi-fosfat (NaPi 50 mM, pH 5.5; 0.36% SDS, 0.5 mM PMSF) amb 10 mU d'endoglicosidasa H (Boehringer Mannheim) durant 18 h a 37°C. La reacció s'atura afegint LSBx3 amb DTT fins a 100 mM. Les mostres es bullen 5 min i s'enmagatzemen a -20°C.

## 1.11 SOLUBILITZACIÓ DE PROTEÏNES DE MEMBRANA

Per purificar proteïnes de membrana integrals per mètodes cromatogràfics, les proteïnes s'han d'extreure de la bicapa lipídica i s'han de dispersar individualment en solució. Això s'aconsegueix de forma efectiva en incubar-ho amb detergents.

Els detergents es poden agrupar en dues classes: iònics -aniònics com ara SDS, sals biliars (colat i deoxicolat), catiònics com ara sals d'alquiltrimetilamoni o zwitteriònics com ara CHAPS- i no iònics (octilglucòsid, digitonina, derivats del polioxietilè com ara TX-100, Tween).

Els detergents s'escullen preparant membranes a una concentració de proteïna coneguda i afegint detergent a diferents concentracions. Normalment la concentració de proteïna està entre 1 i 10 mg/ml, i els percentatges detergent/proteïna (w/w) de 0.1 a 10. La solució s'incuba a 4°C durant 1 hora, i es centrifuga a 105000 g durant 1 hora. Per definició (és un criteri arbitrari), les proteïnes solubilitzades es troben en el sobrenedant. En l'apartat de "Resultats i discussió" mostro un exemple de solubilització amb diferents detergents.

### 1.12 COLUMNA DE TIPUS WGA

La proteïna rBAT té unida glúcids en la seva cadena polipeptídica, com es pot evidenciar en veure el canvi de la mobilitat electroforètica quan es tracta amb endoglicosidasa F. Vam voler veure si la proteïna s'unia en una cromatografia d'afinitat que tenia aglutinina de germen de blat (WGA, un tipus de lectina) unida a agarosa (Vector Laboratories, AL-1023). Per eluir es fa servir *N*-acetilglucosamina a una concentració de 0.5 M, però, com van veure en el nostre cas, a vegades no és suficient i s'ha de baixar el pH del tampó d'elució (per exemple, pH 3.0). Un dels avantatges que presenta aquesta columna és que com que tota columna d'afinitat permet concentrar la mostra, pensàvem a utilitzar-la després d'un procés d'intercanvi iònic. El detergent que es mantenia durant el procés depenia del procés de solubilització que s'havia dut a terme, ho explicaré en aquest cas com si s'hagués utilitzat digitonina a un 1%.

Tot el procés es fa a 4°C i la cromatografia es du a terme en columnes de plàstic de 10 ml (BioRad) que contenen 1 ml de WGA. En primer lloc es renta la columna en tampó de rentatge (50 mM d'Hepes, 150 mM de KCl, 0.1% de digitonina, pH 7.5), per desplaçar el tampó de conservació. A continuació es passa el material solubilitzat (uns 3 ml), que es recull i es torna a passar 2 vegades més, per assegurar la unió de les glicoproteïnes. A continuació es renta amb 100 ml del tampó de rentat i després amb 5 ml del tampó d'elució (50 mM d'Hepes, 150 mM de KCl, 0.1% de digitonina, 0.5 M d'*N*-acetilglucosamina, pH 3.0). Es recullen fraccions de 0.5 ml sobre eppendorfs que contenen 25 µl d'Hepes 1 M, pH 7.5, per tamponar el pH. Es valoren les proteïnes pel mètode de Bradford afegint detergent al patró, ja que l'*N*-acetilglucosamina és incompatible amb el mètode de BCA. Les mostres s'analitzen per transferència Western.

Per regenerar la columna es passen 5 ml de tampó 50 mM de Tris, 0.2 % de detergent, 20 mM d'azida sòdica, 1 M de NaCl. Després 10 ml de tampó 50 mM d'acetat sòdic, 0.2% de detergent, 20 mM d'azida sòdica, 1 M de NaCl i s'omplia amb tampó de 50 mM d'Hepes, 0.2% de detergent i 20 mM d'azida sòdica.



### 1.13 COLUMNA DE TIPUS MONO Q

La cromatografia d'intercanvi iònic separa les biomolècules en funció de les característiques de càrregues. Els grups carregats de les proteïnes interaccionen amb els grups oposats de la resina d'intercanvi iònic. En el cas de les proteïnes de membrana només es poden fer servir detergents que siguin neutres o zwitteriònics, ja que podrien competir amb la resina.

El primer que vam analitzar va ser l'estabilitat de la proteïna solubilitzada a diferents pH, on vam veure que no es degradava. Després, fent servir l'equip *High Trap MonoQ* (Pharmacia), vam posar a punt les condicions de pH i força iònica on vèiem que la nostra proteïna s'unia a la columna. Vam determinar que podíem treballar a 0.1 M de NaCl i pH 7.5. En aquest primer pas s'intenta ja unir la màxima proteïna que estem buscant, no unint també la màxima quantitat de proteïna que no és la que segueixes. Mostro ara un experiment típic d'un pH amb diferents forces iòniques.

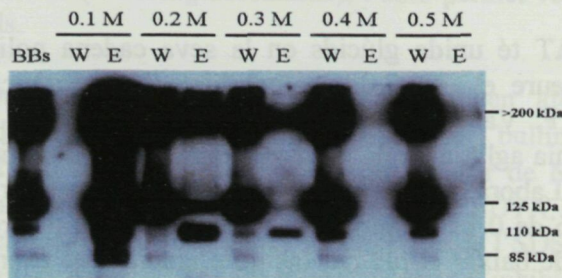


Figura 4. Posada a punt de les condicions de pH i força iònica per unió a columnes de bescanvi d'anions.

Una vegada vam escollir la concentració més idònia vam passar a fer proves pilot utilitzant una columna semipreparativa *Resource Mono Q* (Pharmacia). Vam construir primer un adaptador per poder injectar 5 ml de mostra. La mostra solubilitzada abans d'injectar-se en la columna es filtrava per evitar que entressin trossos de mida gran dins de la columna. Aquest treball es va dur a terme als S. C. T. amb el grup de l'Isidre Casals. Disposàvem de dues bombes A i B on hi havia el tampó amb detergent, el pH escollit i variava la força molar. Al mig hi havia una vàlvula Rheodyne, després la columna *Resource Mono Q* i, finalment, un col·lector de fraccions, on una vegada determinat el fluxe, programàvem el temps per recollir en cada fracció un volum determinat.

Per injectar la mostra es girava la vàlvula cap a l'esquerra en posició *load*, s'introduïa la mostra dins el *loop* amb la xeringa adequada, i s'injectava la mostra dins de la columna girant la vàlvula cap a la dreta (posició *inject*).

Les bombes estaven controlades a partir d'un PC on havíem de programar com havia de ser el funcionament de les bombes. Els tres paràmetres importants eren temps, flux i percentatge de la bomba B (la més concentrada). Escollíem un flux de 2 ml per minut. Teníem un programa d'equilibratge i un programa de la mostra. En "Resultats i discussió" mostro un experiment típic d'aquests, on van arribar a un enriqueïment d'unes 5 vegades respecte a la mostra inicial.



## 1.14 GRADIENTS DE SACAROSA

Un cop s'han solubilitzat les membranes aquestes es carregen en un tub on s'ha fet un gradient de sacarosa en el mateix tampó en que s'ha solubilitzat la mostra. Les explicacions de com es realitza aquest gradient s'epliquen a "Materials i mètodes", en l'apartat de separació d'mRNA per mida. Es centrifuga al màxim de velocitat, 35000 rpm, en el rotor TH641.

Després s'agafen les diferents fraccions punxant a baix del tub i es processen les mostres: *a)* es valora la concentració de proteïna i *b)* s'afegeix LSBx3, es bullen a 95°C durant 3 minuts, i s'analitzen per transferència Western. Mostro una figura d'un gradient de sacarosa 5-40%.

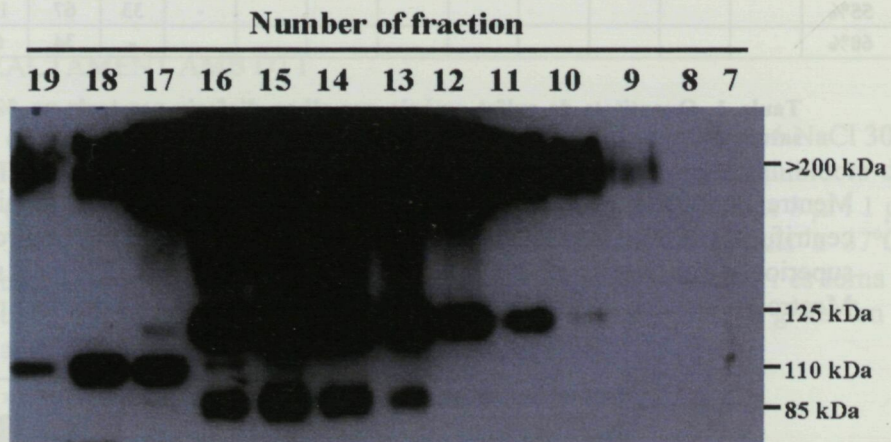


Figura 5. Gradient de sacarosa (5-40%) de membranes apicals solubilitzades.

## 1.15 DIFERENTS TRACTAMENTS DE MEMBRANES

Vam voler fer aquests tractaments per veure si podíem enriquir d'alguna manera la preparació de membranes abans de passar-la per columnes cromatogràfiques.

### 1.15.1 PRECIPITACIÓ AMB SULFAT AMÒNIC.

Les proteïnes en solució formen ponts d'hidrogen amb aigua a través dels seus grups polars. En afegir concentracions altes d'un ió petit i carregat, aquests grups competeixen amb les proteïnes per l'aigua, fet que fa disminuir la seva solubilitat i provoca la seva precipitació. Així, depenent dels grups polars de la proteïna, el pes, el pH de la solució i la temperatura, precipitarà o no. Així vaig solubilitzar membranes apicals i vaig afegir sulfat amònic per tenir diferents concentracions (0, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% i 60% segons la taula següent, que indica els grams que s'han d'afegir a 1 litre de solució. El sulfat amònic saturat és de 4.1 M a 25°C (761 grams).



[inicial]	[final]													
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%
0%	56	114	144	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561
10%	-	57	86	118	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494
20%		-	29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424
25%			-	30	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390
30%				-	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356
35%					-	31	63	94	129	164	200	238	278	319
40%						-	31	63	97	132	168	205	245	285
45%							-	32	65	99	134	171	210	250
50%								-	33	66	101	137	176	214
55%									-	33	67	103	141	179
60%										-	34	69	105	143

Taula 1. Quantitats de sulfat amònic que s'han d'afegir per tenir un % determinat de saturació.

Mentre la solució es va agitant s'afegeix lentament el sulfat amònic. Després se centrifuga a 3000 g durant 30 minuts. Vam observar que el pellet apareixia en la part superior i que només precipitaven proteïnes a partir del 20% de sulfat amònic. Mostro una imatge de transferència Western d'un experiment que van realitzar.

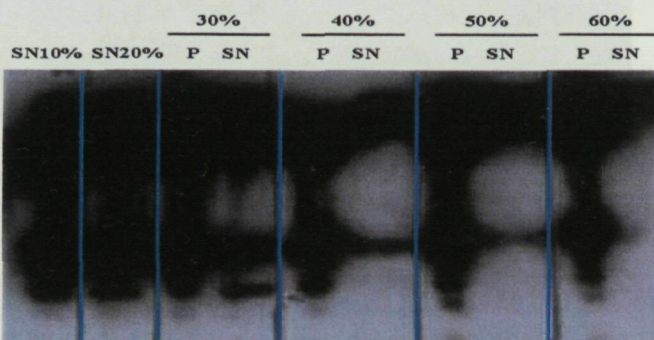


Figura 6. Detecció de la proteïna rBAT després de precipitar-se amb sulfat amònic.

### 1.15.2 TRACTAMENT AMB PROTEASES.

En fer aquest tractament volíem veure si la proteïna rBAT era resistent a la proteasa mentre que altres no ho eren, per després purificar-la per mida. Bàsicament s'agafa al voltant d'1 mg de membrana apical i s'afegeix una proteasa, per exemple 50 µg de tripsina. S'incuba durant 30 minuts a 37°C i es para la reacció en afegir 5 µl de PMSF 4 mM preparat al moment. Se centrifuga durant 20 minuts a 75000 rpm en la centrífuga de sobretaula, es renta el pellet dos cops amb tampó i PMSF i, finalment, es resuspèn en el mateix tampó amb PMSF. Es va observar que la proteasa V8 no afectava la proteïna rBAT mentre que sí que ho feia la tripsina. Presento un exemple de tractament amb tripsina.



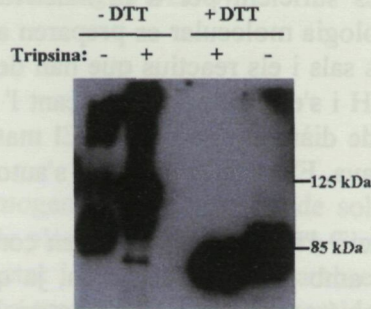


Figura 7. Exemple del tractament de membranes apicals amb tripsina.

### 1.18.3 TRACTAMENT AMB DTT

A 300 µg de membranes apicals (≈ 25 µl), s'afegeixen uns 35 µl del tampó NaCl 300 mM, EDTA 10 mM, Tris 100 mM, pH 7.5. S'afegeix una barreja d'inhibidors de proteases (pepstatina, leupeptina, aprotinina, PMSF, E-64) en un volum de 8 µl i 1 µl de DTT 2M (concentració final 25 mM). S'incuba durant 30 minuts a 37°C. S'afegeixen 70 µl de iodoacetamida 0.4 M dissolta en l'anterior tampó i es torna a incubar durant 15 minuts a 37°C. Es centrifuga durant 1 hora a 100000 g. Es fan 3 rentatges amb PBS i es resuspèn en el volum inicial de PBS.

### 1.16 TINCIÓ DE GELS AMB CLORUR DE PLATA

La tinció amb clorur de plata presenta molta més sensibilitat que la tinció amb blau de Coomassie. Et permet tenir una idea de com és de pura la teva mostra de proteïnes.

Un cop s'ha fet migrar el gel, aquest es fixa durant 1 hora amb un 50% d'etanol, 12% d'àcid acètic preparat el mateix dia. Es fan 3 rentatges de 20 segons amb un 50% d'etanol. Es pretracta amb Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,02% durant 1 minut i es renta 3 cops més amb aigua destil·lada. Es fa la tinció amb 0.2% de AgNO<sub>3</sub> (solució del dia) i es torna a rentar amb aigua. Es fa ara el velatge amb una solució de 6% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.0004% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> i 50 µl de formaldehid per 100 ml (solució del dia). Les bandes solen aparèixer al cap d'uns 5 minuts. Es fan 2 rentatges de 2 minuts amb aigua i es para la reacció amb la solució de fixació. Un cop tenyit el gel s'aseca.

## 2. MANIPULACIÓ I/O DETECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

### 2.1 NORMES GENERALS DE MANIPULACIÓ AMB BACTERIS, DNA I RNA

Quan es treballa amb bacteris s'ha de mantenir un ambient estèril a prop d'una flama. En el cas del DNA o RNA, les manipulacions i solucions han d'estar lliures de la presència de DNAases i RNAases respectivament. S'utilitza l'autoclau durant 20 minuts a 1 atmosfera de sobrepressió per tal d'esterilitzar les solucions i inactivar les

DNAases. Tot i això, no és suficient per a la inactivació de les RNAases més resistents. Els reactius de biologia molecular es preparen amb aigua ultrapura (Milli-Q, Millipore). En general les sals i els reactius que han de mantenir-se en dissolució es dissolen, s'ajusta el seu pH i s'esterilitzen mitjançant l' autoclau o bé per filtració (filtres estèrils de 0.22 µm de diàmetre de porus). El material de plàstic utilitzat és estèril d'origen, o bé s'autoclava. El material de vidre s'autoclava.

Per a la obtenció i manipulació d'RNA s'han tingut en compte mesures de precaució addicionals: 1) manipulació amb guants de cirurgia, ja que les mans són una font molt important de contaminació per RNAases; 2) material de vidre escalfat a 200°C durant un mínim de 4 hores; 3) utilització de material de plàstic estèril d'origen quan sigui possible; si aquest no és el cas (ependorfs, puntes de pipetes automàtiques), cal tenir un estoc reservat per autoclavar, que sempre es manipula amb guants; 4) els reactius utilitzats es tenen reservats per a aquest propòsit (lliures de RNAases), sempre manipulats amb guants i mai s'introdueixen espàtules dins; 5) les varetes magnètiques i recipients que han de contactar amb solucions lliures de RNAases han de tractar-se prèviament a 200°C; 6) els reactius es pesen directament sobre el recipient lliure de RNAases o sobre paper d'alumini que no hagi estat en contacte amb cap possible font de contaminació, les solucions es preparen amb aigua ultrapura (Milli-Q, Millipore) tractada prèviament amb DEPC (vegeu "apèndix") si el reactiu és susceptible de ser autoclavat, el material de preparació de la solució no cal que sigui lliure de RNAases, i el pH pot mesurar-se al pH-metre; ara bé, si no es pot autoclavar, la mesura del pH es fa amb tires de pH sobre les quals es diposita un volum petit de la solució. Per a l'electroforesi d'RNA, s'utilitza un material reservat per a aquesta finalitat (cubeta i pinta); prèviament a la seva utilització s'esbandeixen amb una mica d'etanol i es deixen assecar.

## 2.2 EXTRACCIÓ D'RNA TOTAL A PARTIR DE TEIXITS

### 2.2.1 MÈTODE 1

En aquest procediment és molt important la inactivació de les RNAases endògenes i evitar la contaminació amb RNAases exògenes.

El protocol utilitzat per a l'obtenció d'RNA total correspon al de Chomczynski *et al.*, (1987). Aquest mètode comprèn els passos següents: *a*) el trencament del teixit, *b*) l'eliminació de les proteïnes i del DNA mitjançant l'extracció amb fenol àcid i agents desnaturalitzants de proteïnes com ara el tiocianat de guanidina (aquest agent també actua com a potent inhibidor de ribonucleases) i el sarcosil, i *c*) precipitació de l'RNA amb isopropanol.

#### 2.2.1.a Reactius

Mentre no s'observi el contrari aquests reactius han estat preparats amb aigua DEPC.  
-Solució D suplementada amb 2-mercaptoetanol: tiocianat de guanidina, 4 M; citrat sòdic, pH 7.0, 25 mM; 2-mercaptoetanol, 100 mM. Aquesta solució és fotosensible, es guarda a temperatura ambient protegida de la llum com a màxim tres setmanes. La solució sense suplementar es pot guardar un mínim de tres mesos a temperatura ambient i protegida de la llum.

-Acetat sòdic, 2 M, pH 4-5

-*N*-lauril-sarcosina al 20%

- Fenol àcid (fenol saturat amb aigua DEPC)
- Isopropanol a 4°C
- Etanol al 70% a -20°C
- Aigua DEPC

### 2.2.1.b Procediment

1. 0.5-1 g de teixit s'homogeneïtza en 9.75 ml de solució D suplementada amb 2-mercaptoetanol en tubs de plàstic estèrils del tipus Corning amb el Politró, utilitzant la sonda d'1 cm de diàmetre i mantenint el tub amb el teixit en gel. L'aparell es fa servir a 6 unitats de la seva escala de velocitat durant dos cicles de 30 segons.
2. S'afegeix 250 µl d'*N*-lauril sarcosina al 20% i s'agita; després s'afegeix 1 ml d'acetat sòdic 2 M pH 4, 10 ml de fenol àcid (saturat amb aigua), 2 ml de cloroform i, entre addició i addició, s'agita el contingut del tub. El contingut del tub es transfereix a un tub Córax de 30 ml i es manté en gel durant 15 minuts.
3. Es procedeix a una centrifugació a 10000 g durant 20 minuts a 4°C (8310 rpm pel rotor SA600, Sorvall). L'RNA es recupera a partir de la fase aquosa, que es transferida cap a un tub Córax de 30 ml i s'afegeix un volum d'isopropanol. Es barreja per inversió i es manté el tub a -20°C 1 hora com a mínim.
4. Es precipita l'RNA centrifugant a 10000 g durant 20 minuts a 4°C. El sobrenedant es descarta i el precipitat es resuspèn amb 750 µl de solució D que es transfereixen a un tub eppendorf. S'afegeix 1 volum d'isopropanol, i aquesta segona precipitació a -20°C dura com a mínim 1 hora.
5. Per precipitar l'RNA es centrifuga el tub a 12000 g durant 10 minuts a 4°C. S'elimina el sobrenedant, el precipitat es renta amb etanol al 70% a -20°C i el precipitat s'asseca. Finalment es resuspèn el precipitat amb aigua tractada amb DEPC (500 µl).

### 2.2.2 MÈTODE 2

Aquest mètode rep el nom de guanidinium/CsTFA. Es fa servir quan es vol obtenir un RNA d'alta qualitat, com ara el destinat per construir una genoteca de cDNA. L'isotiocianat de guanidini es fa servir per trencar les cèl·lules i l'homogenat resultant es carrega en un coixí d'una solució densa de trifluoroacetat de cesi, on la densitat de l'RNA ( $\approx 1.9$  g/ml) és molt més gran que altres components cel·lulars. Així, l'RNA (excloent el 5S rRNA i el tRNA) formarà un precipitat mentre que el DNA i les proteïnes es quedaran en el sobrenedant.

El CsTFA<sup>TM</sup> és una solució estandarditzada de trifluoroacetat de cesi, desenvolupada per l'aïllament i separació d'àcids nucleics per centrifugació isopícnica, i produeix preparacions de més alta qualitat que les que es poden obtenir per CsCl o Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El CsTFA solubilitza i desnatura les proteïnes i inhibeix l'activitat nucleasa. És incompatible amb SDS, però un detergent compatible és la sarcosina. La centrifugació amb CsTFA es pot dur a terme entre 4 i 25°C, però la desproteïnitació és més efectiva a temperatures més altes.

#### 2.2.a Reactius

##### 1. Solució desnaturalitzant

- Guanidinium isotiocianat 5.5 M (260 g en 400 ml)
- Na-*N*-lauroil sarcosinat 0.5 % (2 g en 400 ml)
- Na citrat 25 mM (3 g en 400 ml)

- 2-mercaptoetanol (2 ml en 400 ml)
- \*Sigma Antifoam A (2 ml en 400 ml)

Fent servir aigua Milli-Q, s'agita amb aigua calenta en una campana extractora. S'ajusta a pH 7 amb NaOH. S'esterilitza per filtració i s'afegeix (\*) l'Antifoam A. Es guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alíquotes de 20 ml en tubs de polipropilè.

## 2. CsTFA

- CsTFA (Pharmacia)  $\rho = 2.0$  (50 ml en 100 ml)
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$  100 mM (40 ml d'un estoc 250 mM en 100 ml)
- $\text{H}_2\text{O}$  tractada amb DEPC (10 ml en 100 ml)

S'ajusta a pH 7.5 fent servir paper indicador. Es tracten els tubs de centrifuga Beckman 331372 amb  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC (amb rotor SW41) i s'afegeixen 5.0 ml de la solució CsTFA a cada tub. Es poden guardar a  $4^{\circ}\text{C}$  durant un mes.

### 2.2.2.b Procediment

1. Es treuen ràpidament i es pesen en gel 2 grams de teixit en qüestió. Es posa el tros en el tub de polipropilè de 50 ml que conté la part alíquota de 20 ml de solució desnaturalitzant. S'homogeneïtza en politró (25000 rpm, 15-20 s). Els homogenats es poden mantenir a  $4^{\circ}\text{C}$  durant el dia o congelar-se a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
2. Se centrifuguen els homogenats (en els tubs de polipropilè) a 4500 rpm, durant 20 min a  $20^{\circ}\text{C}$  per sedimentar els trossos no disgregats de teixit.
3. Es pipetegen amb cura els sobrenedants ( $\approx 7$  ml) en els tubs de centrifuga que contenen la solució de CsTFA (a prop de 2 mm del final del tub). Els tubs s'equilibren amb solució desnaturalitzant i se centrifuguen a 27000 rpm, durant 24 h a  $15^{\circ}\text{C}$  en el rotor SW41.
4. Es posa un bany a  $68^{\circ}\text{C}$ . Fent servir una pipeta de plàstic amb poc buit, es decanta l'homogenat i es deixa cap avall durant 2-5 min.
5. Fent servir una fulla de tall es treu la part inferior del tub (1 cm). Es mulla el precipitat (blanquinós, quasi transparent) 2 vegades amb aigua DEPC i es transfereix a tubs Eppendorf. Ens hem d'assegurar que l'RNA està dissolt, si no, s'escalfa a  $68^{\circ}\text{C}$ . Es treu 1 ml per mesurar l'absorbància a 260 nm. Es guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.2.c Notes

El pellet d'RNA de fetge pot estar contaminat amb glicogen (que té una  $A_{260}/A_{280}$  d' 1.3), que es pot reduir fent dejunar els animals el dia abans de sacrificar-los. Alternativament, es pot treure de la forma següent: després del pas 4, s'afegeixen 3 volums de 4 M de LiCl o 4 M de NaOAc (pH 7.0) (concentració final de sal, 3 mM), es barreja bé, i es precipita l'RNA tota la nit a  $0^{\circ}\text{C}$  sense etanol. Es centrifuga a 8000 g durant 15 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$ . Aquest pas traurà el glicogen i alguns RNA de baix pes molecular, i per això s'ha d'intentar evitar si és possible.

### 2.2.3 MÈTODE 3

Aquest mètode rep el nom de Trizol i s'ha fet servir per obtenir RNA de cèl·lules en cultiu, en concret de la línia RAW 264.7. És ideal gràcies a la ràpida obtenció de les mostres, encara que la qualitat de l'RNA no sigui molt alta, però és la suficient per poder dur a terme assaigs de transferència Northern.



**2.2.3.a Protocol**

1. S'aspira el medi de les cèl·lules (placa de 10 cm força confluent). S'afegeix 1 ml de la solució Trizol (Life Technologies). Es rascen les cèl·lules i es passen a un tub eppendorf. Es poden congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  o seguir amb l'obtenció.
2. S'afegeixen 200  $\mu\text{l}$  de cloroform. Es barreja. Es deixa 5 minuts a RT. Se centrifuga a  $4^{\circ}\text{C}$  15 minuts a 15000 g.
3. Es treu la fase aquosa (superior) i es transfereix a un nou tub. S'afegeixen 500  $\mu\text{l}$  d'isopropanol. Se centrifuga durant 15 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$  a 10500 g. S'aspira el sobrenedant.
4. Es renta el pellet amb etanol 75%. Es torna a centrifugar. S'aspira el sobrenedant. Es resuspèn amb aigua milli-Q (40  $\mu\text{l}$ ). Es fa servir 1  $\mu\text{l}$  per valorar la concentració i la  $A_{260}/A_{280}$ , que acostuma a tenir valors al voltant d'1.4.

**2.3 PURIFICACIÓ D'RNA POLI(A)<sup>+</sup>**

La major part dels RNA missatgers (mRNA) de les cèl·lules de mamífer presenten una cua de poli(A) en el seu extrem 3', que no és present en els RNA ribosòmics ni de transferència. Això fa que l'mRNA pugui separar-se de la resta d'RNA cel·lulars per cromatografia d'afinitat amb oligo(dT)-cel·lulosa. Aquesta tècnica fou introduïda per Aviv i Leder (1972).

**2.3.1 REACTIUS**

- Tampó de càrrega de la mostra: Tris-HCl pH 7.5, 10 mM; LiCl, 0.5 M; EDTA pH 8, 1 mM; SDS 0.5%
- Tampó de rentat: Tris-HCl pH 7.5, 10 mM; LiCl, 0.1 M; EDTA pH 8, 1mM
- Tampó d'elució: TE (vegeu apèndix)

**2.3.2 PROCEDIMENT****2.3.2.a Preparació de la columna**

Es resuspenen 500 mg d'oligo(dT) cel·lulosa en 10 ml de tampó de càrrega. En general s'aconsella usar 100 mg d'oligo(dT) per mg d'RNA total. En el protocol que es descriu aquí s'ha utilitzat per a 1-5 mg d'RNA total. S'omple una columna estèril (BioRad) amb la solució i s'obre el flux per tal que s'elueixi el tampó de càrrega i la resina quedi empaquetada. No és convenient que la resina s'assequi en cap moment.

**2.3.2.b Preparació de l'RNA**

S'afegeix Tris-HCl 1M, EDTA 0.5 M i LiCl 5 M al tub eppendorf, on es troba l'RNA resuspès en aigua, de manera que la concentració final d'aquests compostos sigui de 10 mM, 1 mM i 0.5 M respectivament (així, l'RNA es troba en tampó de càrrega, exceptuant l'SDS). S'escalfa la mostra d'RNA durant 3 minuts a  $65^{\circ}\text{C}$  i es refreda en gel durant 3 minuts.

**2.3.2.c Cromatografia d'afinitat**

S'aplica la mostra a la columna i tot seguit 2 ml de tampó de càrrega. Es recull l'elut i s'aplica de nou a la columna 2 cops, la primera vegada sense escalfar-lo i la segona, escalfant-lo. Es renta la columna amb 5 ml de tampó de rentatge. S'elueix l'RNA poli(A)<sup>+</sup> amb 1.5 ml de tampó d'elució preescalfat a  $65^{\circ}\text{C}$ . El tampó d'elució s'afegeix



en fraccions de 300 µl. L'eluït es recull tot en el mateix eppendorf. Es reparteix l'RNA recollit en 3 eppendorfs (500 µl a cadascun, s'utilitzen 2 µl per a fer una lectura de DO<sub>260</sub>). La cubeta de quars es renta molt bé abans de dipositar la mostra, ja que aquesta es recupera després. Es precipita l'RNA amb etanol, es resuspèn en un volum petit d'aigua (5-10 µl). Es quantifica espectrofotomètricament i es guarda a -80°C. Se'n comprova la integritat en un gel d'agarosa desnaturalitzant.

#### **2.3.2.d Regeneració de la columna**

Es renta la columna amb 10 ml de TE, tot seguit amb 5 ml de NaOH 0.1 M i finalment amb aigua fins que el pH sigui inferior a 8 (tres rentatges acostumen a ser suficients). Es tapa la columna i s'afegeix etanol. Es recull l'oligo(dT) amb etanol en un tub. Se sedimenta la resina de la solució per centrifugació a baixa velocitat. S'elimina l'etanol. S'asseca la resina en un liofilitzador. Es conserva a -20°C fins a la utilització següent.

### **2.4 SEPARACIÓ PER LA MIDA D'RNA POLI(A)<sup>+</sup> EN GRADIENTS DE SACAROSA**

El gradient de sacarosa és l'últim pas del procés de la purificació de l'RNA, s'ha de tenir molta cura de no degradar-lo al final amb una contaminació d'RNAases.

#### **2.4.1 MATERIAL**

- Formador de gradients, tubs i bomba
- Tubs de centrifuga

#### **2.4.2 PROCEDIMENT**

1. Rentem el formador de gradients i els tubs amb aigua-DEPC 0.1% (no autoclavada) de forma que estigui circulant durant tota la nit. Fem servir un tub nou de centrifuga cada vegada.
2. Traiem aquesta aigua-DEPC. Rentem amb etanol tot el sistema. Tornem a rentar amb aigua-DEPC 0.01% que hagi estat autoclavada. Parem la bomba.
3. Preparem les solucions de sacarosa: 10 ml de sacarosa, 6% (w/v), en tampó TE i 10 ml al 20% (w/v). Fem servir tubs de plàstic estèrils. Si és necessari flamegem una espàtula per pesar la sacarosa.
4. Estem segurs que el formador de gradients està horitzontal (o la càmbra que conté la solució de sacarosa al 6% una mica més alta) i buit. Omplim la càmbra de l'esquerra amb 5 ml de la solució de sacarosa al 6% tenint la vàlvula tancada. Obrim la vàlvula i deixem que entri una mica de solució en l'altre càmbra. Mirem que no quedin bombolles en el tub connector. Tanquem la vàlvula. Recollim la solució que ha entrat en la càmbra de la dreta i la tornem a la càmbra original. Omplim la càmbra de la dreta amb la solució de sacarosa al 20%.
5. Preparem el tub de centrifuga. Engegem la bomba, amb la vàlvula del formador de gradients tancada. Omplim els primers 5 cm amb la solució del 20% i parem la bomba.
6. Iniciem l'agitador magnètic a baixa velocitat (5-6), i obrim la vàlvula i connectem el formador de gradients al mateix moment per evitar la formació de

- bombolles. Formem amb compte el gradient, a una velocitat no molt alta de la bomba ( $\approx 100$  unitats). L'agulla està directament sobre el tub de la centrifuga.
7. Al final, movem el formador de gradients lleugerament per fer arribar tota la solució de sacarosa dins del tub. Posem el tub dins del *bucket* del rotor TH641. Guardem-ho a  $4^{\circ}\text{C}$  durant unes hores. La sacarosa ha d'estar freda per evitar la renaturalització de l'RNA durant la centrifugació.
  8. Són necessaris al voltant de  $150\ \mu\text{g}$  d'mRNA o més. Ha d'estar dissolt en aproximadament  $100\ \mu\text{l}$  de tampó TE. Desnaturalitzem l'RNA durant 5 minuts a  $70\text{-}75^{\circ}\text{C}$ . Refredem-ho en gel. Apliquem l'RNA en la part superior del tub en la càmbra freda. Tanquem el *bucket*. Centrifugem-ho durant 17 hores a  $28000\ \text{rpm}$ .
  9. Parem la centrifuga i preparam els tubs eppendorfs necessaris per recollir les fraccions. Traiem el tub de la centrifuga i amb cura fem un forat en la part inferior del tub al costat. Les primeres gotes sortiran molt ràpidament. Recollim fraccions de  $500\ \mu\text{l}$ .
  10. Precipitem les mostres afegint  $1/10$  de NaOAc  $3\ \text{M}$  i  $2$  volums d'etanol fred. Guardem les mostres a  $-80^{\circ}\text{C}$  durant 1 hora. Centrifugem-ho per 30 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$ . Afegim  $500\ \mu\text{l}$  d'etanol  $70\%$ . Tornem a centrifugar.
  11. Fem migrar en gel  $1\ \mu\text{l}$  de les fraccions juntament amb una part alíquota de l'mRNA original. Valorem la concentració a l'espectrofotòmetre.

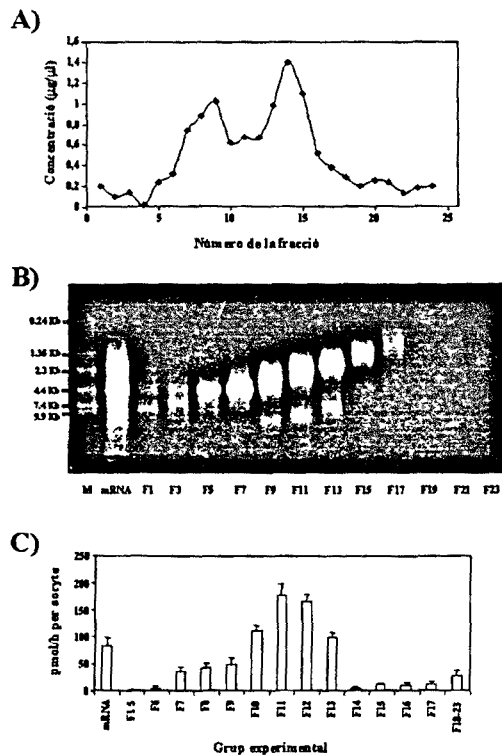


Figura 8. Exemple d'un gradient de sacarosa d'mRNA (ronyó) i el seu processament posterior.

En l'anterior figura presento el resultat d'un gradient d'mRNA de ronyó de rata on es mostra *a*) la concentració de les diferents fraccions *b*), l'aspecte en gel de les fraccions senars *c*) el transport induït de leucina en absència de sodi ( $50\ \mu\text{M}$ ) durant 1 hora en injectar les fraccions en l'oòcit de *Xenopus*. D'aquesta forma va procedir Bertran *et al.*, (1992) per identificar el cDNA d'rBAT. Com es pot observar, les

fraccions que indueixen més transport es troben entre 2.4 kb i 1.35 kb, aquesta seria la mida del missatger responsable de la inducció de transport que veiem amb l'mRNA total.

## 2.5 SEPARACIÓ PER LA MIDA D'RNA POLI(A)<sup>+</sup> MITJANÇANT ELECTROFORESI PREPARATIVA

Aquesta separació va ser duta a terme al laboratori del professor Matthias A. Hediger, durant una estandia predoctoral. Vam decidir fer aquest procés ja que el fraccionament de l'RNA és un procés molt important, perquè redueix el nombre de clons que s'han d'analitzar. Consisteix en un gel d'agarosa d'elució contínua fent servir l'aparell GenePrep dissenyat per Hediger. Aquest sistema no es pot aconseguir comercialment. El sistema més semblant és la màquina d'electroforesi preparativa de la casa BioRad (Miniprep Cell Model 491), però té menys resolució perquè la columna té una mida més petita. Un esquema complet de com funciona el sistema, així com dels passos que s'han de seguir està detallat en la revista *Methods in Enzimology* (1998), en un article escrit pel professor Hediger (Romero *et al.*, 1998). Presento únicament en aquest apartat una fotografia del gradient d'mRNA de pulmó que vaig dur a terme al seu laboratori.

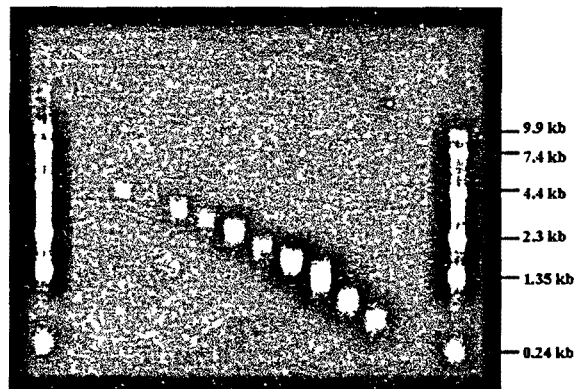


Figura 9. Fotografia d'un gradient d'mRNA de pulmó de rata obtingut al fraccionar aquest mRNA per electroforesi preparativa mitjançant l'aparell GenePrep.

## 2.6 ELECTROFORESI D'RNA EN GELS D'AGAROSA/FORMALDEHID

El gel d'agarosa/formaldehid és un sistema d'electroforesi desnaturalitzant simple on hi ha una bona separació de cadenes senzilles d'RNA (Lehrach *et al.*, 1977). Les condicions d'electroforesi utilitzades en el present treball (Davis *et al.*, 1986) incorporen menys formaldehid que el protocol original i donen també bons resultats. Aquest tipus d'electroforesi permet separar els RNA en funció de la seva mida, atès que estan desnaturalitzats, i la mobilitat electroforètica està en funció del pes molecular. Aquest tipus de gel es fa servir tant per visualitzar l'RNA com per ser sotmès posteriorment a una transferència cap a una membrana, de nilón en el nostre cas, i fer un assaig tipus transferència Northern. Per poder visualitzar l'RNA es preparen les mostres afegint-hi bromur d'etidi (Rosen i Villa-Komaroff *et al.*, 1990).

## 2.6.1 REACTIUS

- Tampó d'electroforesi x10: MOPS pH 7.0, 400 mM; acetat sòdic, 100 mM; EDTA, 10 mM. És fotosensible i es guarda a temperatura ambient.
- Tampó de mostra desnaturalitzant (es prepara en tampó d'electroforesi x1): formamida desionitzada, 48.0%; formaldehid, 6.4% (2.1 M); blau de bromofenol saturat, 0.53%; glicerol, 5.3%. Aquest tampó es guarda a -20°C.
- Gel d'agarosa/formaldehid (es prepara en tampó d'electroforesi x1): agarosa, 1.2%; formaldehid, 0.66 M (s'afegeix just abans d'abocar el gel per polimeritzar, i es fa sota campana extractora).

## 2.6.2 PROCEDIMENT

### 2.6.2.a Preparació de les mostres

Normalment en un gel gran d'RNA (150 ml de solució polimeritzadora) es carreguen 25-30 µg d'RNA total si la pinta és de 16 pous, i de 15-20 µg si la pinta és de 20 pous. En un gel petit (50 ml de solució polimeritzadora) es carregen de 0.5-1 µg d'RNA total. El percentatge d'agarosa utilitzat s'escull en funció de la mida dels RNA que volem resoldre, així en el nostre cas, 1.2 % agarosa (p/v), separa fragments compresos entre 0.4 i 6 kb (Sambrook *et al.*, 1989). Es posa la quantitat desitjada d'RNA en un tub eppendorf estèril. Es concentra la mostra fent una precipitació amb etanol absolut (es porta el volum de la mostra fins a un volum final de 300 µl amb aigua-DEPC, i s'hi afegeixen 30 µl d'acetat sòdic, 2 M pH 4-5, es barreja, i s'hi afegeixen  $(300+30) \times 3 = 990$  µl d'etanol absolut, i es barreja) a -80°C durant un mínim d'1 hora (o en nitrogen líquid durant 1 minut). Es centrifugava a 12000 g durant 30 min a 4°C en una centrífuga de sobretaula. S'elimina el sobrenedant, es renta el precipitat amb etanol al 70% (-20°C), s'asseca bé el precipitat a 65°C com a màxim durant 3 minuts (o bé utilitzant el sistema *speed-vac* 5 minuts). Una forma alternativa de concentrar les mostres sense fer precipitació amb etanol és el sistema *speed-vac*, però si el volum inicial és molt gran, és preferible fer una precipitació amb etanol.

Un cop concentrada la mostra (sense líquid), s'afegeixen a cada tub 19 µl de tampó de càrrega desnaturalitzant i 1 µl de bromur d'etidi (400 µg/ml). Es fa una breu centrifugació (20 segons a 12000 g a temperatura ambient), i s'escalfen en el tubs a 65°C durant 10 minuts. Es mantenen els tubs en gel fins al moment de carregar.

També es preparen els marcadors de pesos moleculars (0.5 µg de marcadors de pes molecular d'RNA (RNA ladder 0.24-9.5 kb; GIBCO BRL núm. cat. 15620-016). Aquests no es concentren, sinó que s'hi afegeixen directament els 19 µl de tampó de càrrega i 1 µl de solució de bromur d'etidi. Es deixa sempre, com a mínim, un pou destinat als pesos moleculars.

### 2.6.2.b Preparació del gel i el sistema d'electroforesi

Normalment el volum del gel és de 150 ml finals. Es pesen 1.8 d'agarosa, es dipositen en un erlenmeyer, s'afegeix 15 ml de tampó d'electroforesi x10 i 126.94 ml d'aigua tractada amb DEPC. Es fon l'agarosa al microones fins que la solució tingui un aspecte homogeni. Es deixa refredar fins a 60°C. Llavors s'afegeixen sota la campana extractora 8.07 ml de formaldehid al 37% a la solució d'agarosa. Ho barregem i

aboquem al sistema de polimerització on ja s'havia col·locat la pinta. Es deixa solidificar el gel, es treu la pinta i s'hi aboca tampó d'electroforesi x1.

Es carreguen les mostres als pous i si la migració era de 16 hores fixem el voltatge a 20 V. Si la migració ha de ser ràpida es fixava el voltatge a 60 V, i es deixa l'electroforesi unes 4-5 hores. L'electroforesi va del pol negatiu al pol positiu i es fa sota la campana extractora.

## **2.7 ASSAIG DE TRANSFERÈNCIA NORTHERN**

Aquest tipus d'assaig permet detectar la presència d'una espècie d'RNA present en una barreja d'RNA utilitzant una sonda específica, a la vegada que permet esbrinar-ne la mida i quantificar-ne l'abundància. Un cop s'han separat els RNA segons la mida mitjançant una electroforesi desnaturalitzant, es transfereixen a una membrana de nilón, on es fixen covalentment. Aquesta membrana se sotmet a la incubació de la sonda (marcada radioactivament) que detectarà l'RNA en qüestió. El principi d'aquest tipus d'anàlisi és anàleg al de la transferència Western, però aplicat a la detecció d'RNA. El mètode descrit es basa en el publicat per Alwine *et al.* (1977). Consta de les fases de transferència, prehibridació, hibridació, rentatges i autoradiografia.

### **2.7.1 TRANSFERÈNCIA**

#### **2.7.1.a Reactius**

- Tampó de transferència: SSC x10 (500 ml)

#### **2.7.1.b Material**

- Paper Whatmann 3MM Chr.
- Membrana de niló (Hybond N, Amersham)
- Paper de filtre

#### **2.7.1.c Procediment**

1. Després de la migració es visualitza la integritat dels RNA col·locant el gel a sobre d'una font de llum ultraviolada. Es fa una fotografia per tal de tenir referència de la migració dels marcadors de pesos moleculars. L'exposició del gel a la llum ultraviolada ha de ser mínima per evitar alteracions dels RNA.

2. El dispositiu de transferència consisteix en una safata de vidre que conté 500 ml d'SSC x10 i sobre la qual transversalment hi ha un vidre, sobre el qual es col·loca el dispositiu. Sobre el vidre es posa un pont de paper Whatmann 3MM de 15-26 cm d'amplada, mullat amb SSC x10, els extrems del qual estan submergits en el líquid de la safata. Sobre aquest pont es col·loca el gel (s'ha retallat prèviament la zona corresponent als pous), de forma que el fons dels pous estiguin en contacte amb la membrana de niló. Es mulla el gel amb SSC x10. La membrana, que ha de tenir la mateixa mida que el gel, es marca en un dels cantons de la superfície en contacte amb el gel amb retolador del tipus perma-marker Staedler, per tenir constància de la cara que contindrà els RNA després de la transferència. Es mulla la membrana i sempre s'ha de tenir cura que no quedin bombolles entre les diferents capes que es van formant. A sobre de la membrana es col·loquen tres papers Whatmann, un sobre l'altre, de la mateixa mida que el gel i es mullen també amb SSC x10. Per tal d'afavorir el pas de líquid només a través del gel, es delimiten els contorns del gel

amb quatre tires de parafilm (a la vegada que impedeix l'evaporació del tampó de transferència). Finalment es posen a sobre una pila d'uns 10 cm de gruix de papers de filtre secs, de la mateixa mida que el gel, un vidre, i a sobre d'aquest un pes de 500 g.

3. Aquest dispositiu funcionava per capil·laritat i es deixa unes 24 hores.

4. Es desmunta la transferència. Es procedeix a la fixació de l'RNA a la membrana mitjançant radiació ultraviolada. La irradiació amb llum ultraviolada, preferentment de 254 nm, fixa l'RNA covalentment al filtre de niló (Sambrook *et al.*, 1989). S'exposa la cara de la membrana que conté els RNA a la font de radiació (BioRad GS Genelinker™, UV Chamber) utilitzant el programa C3 (150 mJ).

5. Un cop fixat l'RNA a la membrana es fotografia la membrana després de la transferència i el gel després de la transferència. La membrana es renta lleugerament amb SSC x2 per tal de treure l'agarosa que pugui romandre sobre la membrana. El gel es llença. La membrana es guarda a 4°C, dins d'una bossa segellada, fins al moment de la prehibridació.

## 2.7.2 PREHIBRIDACIÓ I HIBRIDACIÓ

Les temperatures d'hibridació i els rentatges s'han fixat en funció de la temperatura de fusió ( $T_m$ ) de l'hibrid DNA-RNA, i en funció de la severitat que s'ha volgut aplicar. Les hibridacions s'han fet en condicions relativament laxes, de 20 a 25°C per sota de la  $T_m$ , per tal d'afavorir la hibridació entre la sonda (DNA) i l'RNA. En els rentatges s'ha exercit una astringència més forta. L'estimació de la  $T_m$  està feta d'acord amb la fórmula citada per Wahl *et al.* (1987) per a híbrids DNA:RNA, tenint en compte que un 1% de bases desaparellades (*missmatch*) genera una baixada en 1°C de la  $T_m$ .

$$T_m = 79.8 + 18.5 \log M + 58.4 (GC) + 11.8 (GC) - 820/L - 0.5 (\% \text{ formamida})$$

on  $M$  = concentració molar de cations monovalents ( $\text{Na}^+$ )

$GC$  = fracció molar de bases G i C com a expressió de la composició de bases de la sonda. Si no es coneix s'assumeix 0.5.

$L$  = longitud en nucleòtids de la cadena més curta del dúplex. Hem assumit un valor de 100 en funció de la longitud mitjana de les sondes marcades per *random priming*.

### 2.7.2.a Reactius

- Solució de prehibridació: SSPE x5; formamida desionitzada, 50%; solució de Denhardt x5; SDS, 0.1%; DNA d'esperma de salmó, 200 µg/ml (prèviament sonicat i desnaturalitzat per escalfament a 95-100°C durant 5-10 minuts. Es refreda en gel i s'afegeix a la solució de prehibridació). Es prepara un volum de 100 µl/cm<sup>2</sup> de membrana.

- Solució d'hibridació: SSPE x5; formamida desionitzada, 50%; solució de Denhardt x5; SDS, 0.1%; sulfat de dextrà, 10%; DNA d'esperma de salmó, 200 µg/ml (sonicat i desnaturalitzat); sonda marcada pel mètode de *random priming* amb <sup>32</sup>P 1-1.5 \* 10<sup>6</sup> cpm/ml (la sonda marcada es desnaturalitza per escalfament de 95-100°C durant 5-10 min, es refreda ràpidament en gel, després s'afegeix a la barreja d'hibridació). Es prepara un volum de 100 µl/cm<sup>2</sup> de membrana.

- Tampó de rentatge 1: SSC x2

- Tampó de rentatge 2: SSC x0.4, SDS, 0.1%

### **2.7.2.b Procediment**

La manipulació de  $^{32}\text{P}$  es fa darrere de pantalles de metacrilat protectores, amb les mesures de precaució necessàries.

1. Prehibridació. S'incuba la membrana en una bossa de plàstic segellada que conté la solució de prehibridació. La incubació es fa a  $45^{\circ}\text{C}$  durant 3-6 hores amb agitació.
2. Hibridació. Eliminem el líquid d'hibridació i a la mateixa bossa afegim la solució d'hibridació que conté la sonda marcada. Incubem de 12 a 16 hores a  $42^{\circ}\text{C}$ .
3. Rentatges. S'elimina la barreja radioactiva com a residu radioactiu de  $^{32}\text{P}$ . La membrana es col·loca en una safata que conté el tampó de rentatge 1. Aquest rentatge dura 15 minuts a temperatura ambient i amb agitació. Es renta la membrana amb el tampó de rentat 2, 20 min a  $55^{\circ}\text{C}$ , amb agitació. Finalment, es renta la membrana amb el tampó 2, 30 min a  $55^{\circ}\text{C}$ . S'elimina l'excés de líquid de la membrana i no es deixa assecar, sinó que es guarda dins d'una bossa de plàstic per a l'exposició autoradiogràfica. S'utilitzen les mateixes pantalles intensificadoras i cassets d'exposició que per als assajos de transferència Western i films Agfa CURRIX RP2, i Kodak X-OMAT AR. L'exposició es fa a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.7.3 DESHIBRIDACIÓ DE LES MEMBRANES DE NILÓ**

Per tal de poder tornar a hibridar la membrana amb una altra sonda, si escau, s'ha de procedir a la deshibridació de la sonda de cDNA hibridada prèviament amb l'RNA transferit a la membrana. Aquest procés es du a terme rentant la membrana en condicions d'alta astrigència. S'ha de tenir en compte que aquest procés no es pot repetir indefinidament, ja que en cadascun d'aquests rentatges hi ha una certa quantitat de mostra (RNA) que també es deslliga de la membrana de niló. En el present treball les membranes s'han deshibridat un màxim de dues vegades.

#### **2.7.3.a Reactius**

- Tampó de deshibridació: SSC x 0.1; SDS 0.1%

#### **2.7.3.b Procediment**

1. Es col·loca la membrana dins d'una safata, i s'aboca sobre la membrana el tampó de deshibridació ja bullent. S'incuba la membrana amb aquest tampó 30 min a  $90^{\circ}\text{C}$  amb agitació.
2. S'elimina l'excés de líquid i es posa la membrana dins d'una bossa de plàstic segellada a  $4^{\circ}\text{C}$  fins a la següent prehibridació i hibridació corresponents.

## **2.7 PURIFICACIÓ DE DNA PLASMÍDIC**

L'objectiu d'ambdós processos és obtenir petites quantitats (10-20  $\mu\text{g}$  a les minipreparacions) o, grans quantitats (500-1000  $\mu\text{g}$  a les maxipreparacions) de DNA plasmídic transformat purificat. Per aconseguir aquest propòsit s'han d'eliminar la resta de components cel·lulars: proteïnes, RNA, DNA cromosòmic, etc. En el present treball les minipreparacions s'han fet utilitzant l'equip comercial de Promega (Wizard Minipreps<sup>TM</sup> DNA Purification System, Promega; núm. cat. A7500) o Qiagen. Les maxipreparacions s'han fet utilitzant l'equip comercial de Qiagen (Qiagen Plasmid kit; núm. cat. 12163).



## 2.8.1 MAXIPREPARACIONS

Es duen a terme d'acord amb les instruccions de l'equip comercial Qiagen Plasmid Maxi Kit. El principi d'aïllament es basa en una lisi alcalina modificada dels bacteris, i la unió del DNA a una resina de bescanvi iònic (Qiagen) sota les condicions de baixa salinitat i pH adients. RNA, proteïnes i impureses s'elueixen per un rentatge de salinitat mitjana. El DNA plasmídic s'elueix en una concentració elevada de sals, i es concentra utilitzant una precipitació amb isopropanol.

### 2.8.1.a Reactius

- P1 (tampó de resuspensió): 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM d'EDTA; 100µg/ml de RNasa A (es manté a 4°C)
- P2 (tampó de lisi): 200 mM de NaOH; 1% SDS (temperatura ambient)
- P3 (tampó de neutralització): 3.0 M acetat potàssic, pH 5.5 (temperatura ambient o 4°C)
- QBT (tampó d'equilibració): 750 mM, NaCl; 50 mM, MOPS, pH 7.0; 15% d'etanol; 0.15% de Tritó-X-100 (temperatura ambient)
- QC (tampó de rentatge) : 1.0 M de NaCl; 50 mM de MOPS, pH 7.0; 15% d'etanol (temperatura ambient).
- QF (tampó d'elució): 1.25 M de NaCl; 50 mM de Tris-HCl, pH 8.5; 15% d'etanol (temperatura ambient).
- TE 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM d'EDTA (temperatura ambient).
- Isopropanol
- Etanol al 70%

### 2.8.2.b Material

Es parteix de 500 ml de cultiu líquid LB-ampicil·lina, crescut durant 12-16 hores a 37°C amb agitació.

### 2.8.2.c Procediment

1. Es centrifuga el cultiu cel·lular a 4°C durant 15 minuts a 6000 g (al voltant de 6000 rpm del rotor GSA Sorvall). S'eliminen totes les restes de sobrenedant per inversió dels tubs.
2. El precipitat es resuspèn en 10 ml de tampó P1.
3. S'afegeix 10 ml de tampó P2, es barreja per inversió i s'incuba a temperatura ambient durant 5 minuts (no més de 5 minuts).
4. S'afegeix 10 ml de tampó P3 i ho agitem per inversió.
5. S'efectua una centrifugació a 4°C durant 30 minuts a 30000 g. Es recupera el sobrenedant. Si aquest no té una aparença clara, es procedeix a una altra centrifugació durant 15 minuts a 30000 g.
6. S'equilibra una columna Qiagen amb 10 ml de tampó QBT.
7. S'aplica el sobrenedant obtingut al pas 5, i es deixa que circuli per gravetat. Es renta la columna dos cops amb 30 ml de tampó QC.
8. L'elució del DNA es fa amb 15 ml de tampó QF.
9. El volum recollit en tubs de 30 ml es precipita amb isopropanol (0.7 volums) a temperatura ambient. Es centrifuga 15000 g durant 30 minuts a 4°C.
10. Es renta el precipitat amb etanol al 70% a -20°C (15 ml). Es centrifuga un altre cop, s'elimina el sobrenedant i es deixa assecar a temperatura ambient durant 5 minuts.
11. Es resuspèn el precipitat (DNA plasmídic) en TE (500-1000 µl).



En general, el DNA de minipreparacions o maxipreparacions tornava a ser examinat per anàlisi de restricció, i si s'ha d'utilitzar per transfectar cèl·lules eucariotes se sotmet a una precipitació amb etanol per esterilitzar-lo. Breument, aquesta precipitació consisteix a afegir acetat sòdic (2 M, pH 4-5), 1/10 del volum de la preparació; i de 2.5 a 3 vegades el volum de mostra més acetat d'etanol absolut a -20°C; es deixa precipitar a -80°C un mínim de 2 hores; es centrifuga durant 30 minuts a 12000 g a 4°C, es renta amb etanol al 70%, sense resuspendre, es centrifuga 10 minuts a 4°C a 12000 g, s'elimina el sobrenedant, s'asseca a temperatura ambient o 65°C (un màxim d'1 minut 30 segons), i finalment es resuspèn en TE estèril. Després es torna a quantificar.

### 2.8.3 MINIPREPARACIONS

Normalment, el volum de cultiu del qual es parteix és de 5 ml de cultiu bacterià. Bàsicament en aquesta tesi s'han utilitzat dos equips de purificació: Wizard de la casa Promega i Miniprep Purification Kit, de la casa Qiagen. En aquesta tesi s'ha descrit el primer mètode.

#### 2.8.3.a Reactius

- Solució de resuspensió: Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; EDTA, 10 mM; RNAasa A, 100 µg/ml
- Solució de lisi: NaOH ,0.2,M; SDS 1%
- Solució de neutralització: acetat potàssic, pH 4.8, 2.55 M
- *Magic Minipreps™ DNA Purification Resin*
- Solució de rentatge de la columna: NaCl, 200 mM; Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM; EDTA, 5mM (Aquesta solució es barreja 1:1 amb etanol absolut)

#### 2.8.3.b Material

- Es parteix d'un precultiu (12-16 hores a 37°C) amb ampicil·lina de 2-3 ml.

#### 2.8.3.c Procediment

1. Es reparteix els 3 ml de cultiu en tubs eppendorf. Es centrifuguen en una centrífuga de sobretaula a 12000 g durant 5 min a temperatura ambient.
2. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el precipitat en 200 µl de solució de resuspensió.
3. S'afegeix 200 µl de solució de lisi, es barreja per inversió, fins que la solució es torni clara. S'afegeix 200 µl de solució de neutralització.
4. Es centrifuga a 12000 g durant 5 min en una centrífuga de sobretaula a temperatura ambient.
5. Es transfereix el sobrenedant a un eppendorf nou, s'afegeix 1 ml de la resina de l'equip i es barreja per inversió. Encara que no s'observi en les instruccions sembla haver-hi una millor recuperació de DNA deixant la resina d'1 hora a 1 hora i 30 min en contacte amb el DNA.
6. Es connecta una columna amb una xeringa de 2 ml a la qual s'ha tret prèviament l'èmbol, es decanta el contingut de l'eppendorf amb la resina a dins de la xeringa, i es fa una lleugera pressió amb l'èmbol.
7. Es desconnecta la xeringa sencera de la columna, es treu l'èmbol, es torna a connectar la xeringa i s'hi aboquen 2 ml de solució de rentatge, es torna a fer una lleugera pressió, i es desconnecta la xeringa sencera. Es fa una breu centrifugació de

2 minuts a 12000 g en una centrífuga de sobretaula a temperatura ambient, per treure l'excés de solució de rentatge.

8. Es trasllada la columna a un tub eppendorf nou, s'apliquen 50 µl de TE preescalfat a 65°C, es deixa 1-2 min i es fa una centrifugació d'1 min a 12000 g, d'on s'elueix el DNA plasmídic associat a la resina. S'utilitzen uns 5 µl per a la quantificació espectrofotomètrica del DNA (DO<sub>260</sub>) fent un perfil de l'absorbància de 220-320 nm (tal com es fa per a l'RNA) i la resta es guarda a -20°C.

## 2.9 OBTENCIÓ DE BACTERIS COMPETENTS I TRANSFORMACIÓ

Per tal de poder comptar amb quantitats suficients de DNA per a les seves diferents utilitzacions (marcatge de sondes, anàlisi de restricció, transfeccions en cèl·lules eucariotes) s'ha d'amplificar la quantitat que hi ha. Si es parteix de DNA plasmídic recombinant purificat, que conté l'insert d'interès, com que es tracta d'un DNA amb capacitat autoreplicativa en cèl·lules bacterianes, es procedeix a transformar bacteris (introduir el DNA plasmídic recombinant). Els bacteris utilitzats normalment són soques d'*Escherichi coli*, en el nostre cas és la soca d'*E. coli* anomenada DH5α (Hanahan *et al.*, 1983; Bethesda Research Laboratories, 1986), anomenats competents perquè els hem sotmès a un procés de sensibilització a la transformació. Un cop han estat transformats els bacteris, es fan créixer en plaques d'agar amb l'antibiòtic al qual siguin resistents només els bacteris que hagin incorporat el DNA plasmídic exogen (el qual codifica per a la resistència cap a aquest antibiòtic), en el nostre cas es tracta de l'ampicil·lina (una penicil·lina semisintètica que, per tant, actua blocant la síntesi de peptidoglicans de la paret bacteriana). A partir del moment que tenim el DNA recombinant introduït en bacteris s'amplifica per creixement d'aquestes cèl·lules en medi selectiu amb ampicil·lina. S'extreu el DNA plasmídic d'aquests bacteris mitjançant equips comercials per fer Maxi-Preps (Qiagen) i Mini-Preps (Promega o Qiagen), es quantifica el DNA, s'efectua anàlisi de restricció per comprovar la integritat i qualitat del DNA amplificat.

### 2.9.1 MÈTODE DEL CLORUR DE CALCI

La soca d'*E. coli* utilitzada en aquest treball ha estat DH5α (desenvolupada per Hanahan *et al.*, 1983). El mètode utilitzat ha estat el de Cohen *et al.*, (1972) introduint-hi unes lleugeres modificacions. El principi és tractar els bacteris en fase de creixement exponencial amb CaCl<sub>2</sub>, que permeabilitza la paret cel·lular bacteriana al DNA exògen.

#### 2.9.1.a Reactius

- Medi de cultiu de bacteris (LB).
- Solució de CaCl<sub>2</sub>, 50 mM, estèril preparat amb aigua Milli-Q per filtració amb 0.22 µm

#### 2.9.1.b Procediment

1. S'inoculaven 3 ml d'LB sense ampicil·lina amb les cèl·lules (DH5α en el nostre cas) que s'han de transformar. Es deixen créixer tota la nit a 37°C amb agitació.
2. L'endemà es dilueix el precultiu 1/100 (v/v) en LB (250 µl de precultiu en 25 ml finals), i s'incuba a 37°C amb agitació fins que la DO a 600 nm estigui compresa entre 0.3 i 0.4 (normalment de 2 a 3 hores d'incubació). La dilució de les cèl·lules es

fa en dos tubs Corning estèrils de 50 ml, que contenen cadascun 25 ml de dilució 1/100. El valor de densitat òptica escollit correspon aproximadament a  $5 \cdot 10^7$  cèl·lules/ml (convé no sobrepassar el límit de  $10^8$  cèl·lules/ml per tenir una transformació eficient).

3. Per tal d'aturar el creixement es mantenen un mínim de 15-25 minuts en gel. A partir d'aquest moment, mentre no s'indiqui el contrari, els bacteris s'han de mantenir a una temperatura compresa entre 0 i 4°C.

4. Es centrifuguen les cèl·lules a 4000 rpm a la centrífuga RC-3B (Sorvall Instruments) 5 min a 4°C (s'elimina, o es redueix a la meitat). S'elimina el sobrenedant per decantació en un ambient estèril (al costat de la flama), i es resuspenen les cèl·lules en 25 ml de solució freda de CaCl<sub>2</sub>, 50 mM (12.5 ml/25 ml originals, o el que és el mateix, per tub Corning de 50 ml). La resuspensió es fa per agitació manual i si cal molt breument amb el vòrtex amb una potència baixa, ja que no convé augmentar la temperatura.

5. Es deixa la suspensió en gel durant 30 minuts.

6. Es torna a centrifugar a 4000 rpm, durant 5 min a 4°C (s'elimina el fre, opcional).

7. S'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb 2 ml de CaCl<sub>2</sub>, 50 mM (2 ml/25 ml de cultiu original), i es mantenen a 4°C. En aquest punt les cèl·lules ja eren competents i la seva eficiència de transformació s'incrementava de 4 a 6 vegades durant les primeres 12-24 hores posteriors a la seva obtenció si es mantien a 4°C, després d'aquest interval de temps l'eficiència baixa al nivell original (Sambrook *et al.*, 1989), i ja no és recomanable utilitzar-les. Encara que es recomani guardar estocs congelats de cèl·lules competents en el present treball totes les preparacions s'han obtingut el mateix dia o el dia abans.

## 2.9.2 TRANSFORMACIÓ DE LES CÈL·LULES COMPETENTS

### 2.9.2.a Material

- Plaques amb LB-agar, amb ampicil·lina (100 µg/ml de concentració final, vegeu apèndix)

- Bacteris competents

### 2.9.2.b Procediment

1. Per cada 200 µl (tubs de 15 ml) o 100 µl (tubs eppendorf) de cèl·lules competents s'afegeix al voltant de 50 ng (0-100 ng) de plasmidi recombinant. La barreja es fa en tubs de polipropilè estèrils de 15 ml o bé en eppendorfs estèrils agitant manualment i suaument. Es deixen bacteris i DNA durant 30-60 min en gel.

2. S'incuba durant 2-3 minuts (nosaltres fèiem 2 minuts i 30 segons) a 42°C (xoc tèrmic). Es tornen a deixar en gel 2 minuts. S'afegeix 800 µl d'LB sense ampicil·lina al tub de 15 ml i s'incuba durant 1 hora a 37°C amb agitació. En cas que el xoc tèrmic s'hagi dut a terme en tubs eppendorf s'afegeix 400 µl d'LB i la incubació es fa sense agitació, i amb el tub completament tancat. Aquesta incubació d'1 hora té com a finalitat l'expressió de la resistència a l'ampicil·lina continguda en el plasmidi.

3. Se sembra una part alíquota (al voltant de 200 µl) dels bacteris transformats en una placa d'LB-agar que contingui ampicil·lina. Es deixa una estona a temperatura ambient fins que tot el líquid s'hagi absorbit, després es deixen en posició invertida a 37°C de 12 a 16 hores. Paral·lelament es fa un control negatiu de transformació, en el qual se sembren cèl·lules competents sense transformar. La resta de volum de cultiu no plaquejat es guarda a 4°C un màxim de 3 o 4 dies. Si es volen plaquejar més de

200 µl es procedeix a una breu centrifugació de les cèl·lules transformades i es resuspenen en un volum inferior a l'original, per exemple 500 o 400 µl.

4. Es piquen diverses colònies, es fan precultius amb 3-4 ml d'LB amb ampicil·lina, per tal de fer minipreparacions i analitzar aquelles que hagin incorporat el plasmidi. Es fa l'anàlisi de restricció oportuna. De les colònies que ens interessin es fan cultius de glicerol (glicerol al 15%), que es congelen ràpidament amb nitrogen líquid i es mantenen a -80°C.

### 2.9.3 ELECTROPORACIÓ

Una altra forma de fer que els bacteris siguin competents és mitjançant un xoc elèctric. Hem utilitzat l'electroporador de Life Technologies (Cell Porator) acoblat a un amplificador en el cas de fer-ho amb bacteris (Voltage Booster).

El DNA que es vol transformar mitjançant electroporació ha d'estar lliure de sals. Això implica que reaccions com ara lligacions, mutagènesi, etc., s'han de precipitar abans amb etanol i s'han de rentar bé amb etanol al 70%.

Per preparar els bacteris competents s'ha seguit el protocol segons les especificacions de la casa comercial. Una particularitat és que les bactèries han de créixer fins a una densitat òptica a 600 nm de 0.9. Això fa que sigui molt important tenir els bacteris ben resuspesos abans de fer la transformació. Els bacteris competents es poden emmagatzemar a -80°C fins a 3 mesos, però van perdent la capacitat de competència.

Les condicions d'electroporació que hem vist més idònies són *Voltage Booster* 4 kΩ, *Capacitance* 330 µF, *Low Ω*, *Fast charge*. Així, s'agafen 1 o 2 µl del DNA que vulguem com a màxim, es barregen amb 25 ml de bacteris competents i es posa sobre una cubeta d'electroporació (entre els dos elèctrodes) que haurà estat en gel per refredar-la. Es carrega l'electroporador fins a 375 V (*charge*), i es fa la descàrrega (*Army, Trigger*). Hem de veure en el voltage aplicat en el *voltage booster* que apliquem al voltant de 2.3 kV.

Es recullen els bacteris i es posen a créixer amb 1 ml de medi de creixement (SOC, LB, 2 x YT) durant 1 h a 37°C amb molta agitació, i es plaqueja sobre plaques d'LB-agar amb ampicil·lina.

## 2.10 DIGESTIÓ DE DNA AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ

Les digestions de DNA amb enzims de restricció s'han fet d'acord amb les instruccions de les cases comercials que subministren els enzims. En general s'ha utilitzat el tampó de digestió indicat per la casa comercial (normalment concentrat 10x). D'altra banda, a l'hora de fer digestions s'ha tingut en compte que el volum d'enzim afegit no sobrepassés el 10% del volum final, perquè una concentració final de glicerol superior al 5% (l'enzim se serveix en una preparació al 50% de glicerol) podria inhibir l'activitat enzimàtica. La quantitat d'enzim utilitzada ha estat d'1-10 U/µg de DNA. Les digestions s'han dut a terme a 37°C, durant 2-4 hores, depenent de l'eficiència de la reacció.

Quan es tracta de reaccions de digestions dobles o triples, si el tampó de reacció es comú als tres enzims, la incubació del DNA amb els tres enzims és simultània. En cas

que algun dels enzims fos incompatible amb les condicions de reacció dels altres, es fan les digestions en dues fases: el DNA digerit a la primera digestió s'extreu del tampó i enzim utilitzat mitjançant una extracció fenol-cloroform.

## **2.11 EXTRACCIÓ AMB DISSOLVENTS ORGÀNICS I PRECIPITACIÓ DEL DNA**

### **2.11.1 REACTIUS**

- Fenol-cloroform (1:1) (vegeu "Apèndix")
- Acetat sòdic, 2 M pH 4-5
- Etanol absolut a -20°C
- Etanol al 70% a -20°C
- TE

### **2.11.2 PROCEDIMENT**

1. Al volum de partida de la mostra s'afegeix aigua destil·lada fins a assolir un volum final de 300 µl.
2. S'afegeix un volum igual de fenol-cloroform (300 µl). Es barreja amb vòrtex durant 20-30 segons, se centrifuga 2 minuts a 12000 g a la microfuga de sobretaula a temperatura ambient.
3. Es recupera el sobrenedant, s'afegeix acetat sòdic, 2 M pH 4-5, fins a assolir una concentració final de 0.3 M, es posa al vòrtex i s'afegeixen 2.5 volums (300 µl de sobrenedant + 45 µl d'acetat = 345 µl; 345 \* 2.5 = 862 µl d'etanol) d'etanol absolut a -20°C, es barreja. Es deixa a -80°C, un mínim de 2 hores. Se centrifuga durant 30 minuts a 4°C a 12000 g.
4. Es renta el precipitat amb etanol al 70% a -20°C. Es deixa assecar el DNA de 30 a 45 segons a 65°C, o a temperatura ambient. Es resuspenen en TE, agitant externament el tub amb un dit i centrifugant 20 segons a 12000 g. Aquest procés de resuspensió es repeteix 3 o 4 cops fins que el DNA està ben resuspès.

## **2.12 ELECTROFORESI DE DNA EN GELS D'AGAROSA**

Per monitoritzar la qualitat de les digestions i visualitzar els fragments generats es du a terme l'electroforesi en gels d'agarosa no desnaturalitzant, de forma que el fragments separats siguin dúplex de DNA, i així la migració és inversament proporcional al logaritme del pes molecular. El percentatge d'agarosa utilitzat és d'un 1%, i això ens permet tenir una bona resolució dels fragments de mida compresa entre 0.4 i 10 kb. En paral·lel a les mostres sempre s'han carregat marcadors de pesos moleculars (GIBCO BRL 1 kb DNA ladder, núm. cat. 15615-016; 1µg/µl). Per a anàlisis de restricció rutinàries es carrega una petita part alíquota de la mostra digerida, si la digestió ha funcionat es passa al pas de purificació de la banda que ens interessa.

### 2.12.1 REACTIUS

- TAE (tampó Tris/acetat) x50: Tris-base, 2 M; àcid acètic, 1 M; EDTA, 50mM (es guarda a temperatura ambient)
- Tampó de càrrega x5: EDTA, 40 mM; SDS, 0.1%; Ficoll 400, 30%; blau de bromofenol, 0.2% (es guarda a -20°C alíquotat, i l'alíquota que s'estigui utilitzant a 4°C).
- Gel d'agarosa: Es prepara en tampó TAE x1: agarosa a l'1%; 0.08 µg/ml de bromur d'etidi. Alternativament, es pot afegir bromur d'etidi a les mostres (1 µl per mostra), o bé tenyir el gel després de la migració en una solució de TAE x1 o aigua destil·lada que contingui 0.5 µg/ml de bromur d'etidi. Normalment es preparen minigels de 50 ml de volum total.
- Pesos moleculars

### 2.12.2 PROCEDIMENT

1. Les mostres es preparen de forma que hi hagi d'1 a 2 µg de DNA per mostra carregada i que el volum final de mostra carregada (que s'assoleix amb el DNA, tampó de càrrega de la mostra i aigua destil·lada estèril) sigui de 10 o 12.5 µl. Si es carrega massa DNA per carril, les bandes són massa amples i pot comprometre's la resolució de bandes. El mateix passa amb els marcadors de pesos moleculars, que es processen igual que les mostres. Normalment, de pesos moleculars, se'n carreguen d'1 a 2 µl (1-2µg).
2. El gel es prepara amb 0.5 g d'agarosa i s'afegeixen 50 ml de TAE x1, es deixa bullir al microones fins que l'agarosa s'hagi fos. Es deixa temperar a 60°C i llavors s'afegeix el bromur d'etidi. Es barreja i es diposita a la safata de polimerització, que ja té la pinta col·locada.
3. Un cop polimeritzat el gel es treu la pinta i es col·loca el gel a la cubeta d'electroforesi (la migració va del pol negatiu al positiu), es cobreix amb tampó d'electroforesi TAE x1 i es carreguen les mostres. La migració es fa normalment a 60-70 volts, controlant la migració del front.

## 2.13 PURIFICACIÓ DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA

S'han fet servir dos mètodes. El mètode de l'electrolució s'ha fet servir per aïllar fragments que havien de ser sotmesos a tractaments posteriors (lligaments, ompliment, etc.), ja que el segon mètode podria alterar els extrems d'aquest fragments i interferir els tractaments posteriors. El segon mètode que es va fer servir va ser l'equip comercial de la casa Promega: Magic<sup>TM</sup> PCR Preps DNA Purification System for Rapid Purification DNA fragments o l'equip de la casa Qiagen. No explico cap dels dos equips, ja que el fonament és molt similar al que he explicat en la purificació del DNA.

### 2.13.1 MÈTODE DE L'ELECTROLUCIÓ

#### 2.13.1.a Material

- Bosses de diàlisi (membrana de cel·lulosa) d'amplada 10 mm i de porus de 12000 D (Sigma, cat.no D-9277)
- Pinça

- Fulla de bisturí

### 2.13.1.b Procediment

1. Es prepara un gel d'agarosa a l'1% unint dos pous amb cinta adhesiva, de forma que es fa migrar tot el volum de la digestió en un pou gran (50-100 µl). Es neteja la cubeta d'electroforesi i la safata de polimerització per tal d'evitar contaminacions amb altres DNA, tampoc es carreguen marcadors de pesos moleculars en el mateix gel, només es carrega una mostra pel mateix motiu abans esmentat. Es deixa migrar fins que la banda que volem purificar estigui ben separada de la resta (això es visualitza al transluminador, s'han d'evitar sempre que sigui possible les exposicions del DNA a la llum ultraviolada, ja que pot provocar mutacions).

2. La banda es talla del gel amb una fulla de bisturí, es posa el rectangle d'agarosa que conté la banda en una bossa de diàlisi que es tanca per un dels extrems i s'afegeixen seguidament 200 µl de TAE x1 i es tanca l'altre extrem de la bossa. Seguidament es sotmet a una electroforesi en la mateixa cubeta a 100 V durant 60 min. S'atura l'electroforesi i es comprova en el transluminador que el DNA estigui enganxat a la paret orientada cap al pol positiu de la cubeta. Es treu el tros d'agarosa, es torna a tancar la bossa, i se sotmet durant 1-2 min a 100 V amb polaritat contrària per tal de desenganxar el DNA de les parets de la bossa. Es comprova que realment s'ha desenganxat (en el transluminador), es buida amb l'ajut d'una pipeta automàtica el contingut de la bossa i es renta amb 200 µl addicionals de TAE x1 la paret de la bossa.

3. El volum final recuperat (400 µl) se sotmet a una extracció de fenol-cloroform i a una posterior precipitació amb etanol.

## 2.14 MARCATGE RADIOACTIU DE LA SONDA DE DNA PEL MÈTODE *RANDOM PRIMING*

Aquest mètode va ser posat a punt per Feinberg *et al.*, (1983) i Vogelstein *et al.*, (1984). Es desnatura la sonda que es vol marcar i es posa en presència d'una barreja de tots els hexanucleòtids diferents possibles, junt amb una barreja de desoxiribonucleòtids-trifosfat, dels quals un com a mínim està marcat en posició  $\alpha$  amb fòsfor-32 i de l'enzim Klenow. Els hexanucleòtids (*primers*) s'hibriden allà on troben una seqüència complementària al DNA desnaturitzat i l'enzim Klenow a partir d'aquells sintetitza la cadena complementària, i incorpora nucleòtids marcats a l'extrem 3'-OH de la cadena nova. Així s'obtenen sondes marcades uniformement i d'alta activitat específica.

En el present treball s'ha utilitzat el kit comercial de Boehringer Mannheim *Random Primed Labelling Kit* (núm. de cat. 1004760). El desoxiribonucleòtid-trifosfat marcat ha estat [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Amersham, núm. cat. AA0005; Redivue 3000 Ci/mmol). Per tal de separar la sonda marcada de la resta d'hexanucleòtids i de nucleòtids no incorporats, es fa una cromatografia d'exclusió en columna de Sephadex G50 (NICK<sup>TM</sup> column, Pharmacia); i es quantifica el percentatge de radioactivitat incorporada.

### 2.14.1 REACTIUS

- Reaction Mixture x10 (RM x10). Aquesta solució està subministrada per l'equip i conté els hexanucleòtids dissolts en TE
- dATP, dTTP i dGTP, 0.5 mM (solucions subministrades per l'equip). Es prepara una barreja equimolar dels tres anomenada dNTPs-(C)
- Tampó STE: Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM; NaCl, 100 mM; EDTA 1 mM
- Sonda de cDNA (25-40 ng)
- Enzim Klenow (2 U/ $\mu$ l)
- 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP Redivue (Amersham)

### 2.14.2 PROCEDIMENT

1. En el tub eppendorf on es duu a terme la reacció s'afegeix 35 ng de sonda de DNA purificada, es porta a un volum final de 9  $\mu$ l amb aigua estèril i es denaturalitza escalfant-ho a 100°C durant 5 minuts. Després es manté en gel fins al moment de començar la reacció per evitar la renaturalització del DNA (es fa una breu centrifugació, 30 segons, a 4°C a 12000 g en una centrífuga de sobretaula).
2. S'afegeix 2  $\mu$ l de RM x10.
3. S'afegeix 3  $\mu$ l de dNTPs-(C).
4. Es fa una breu centrifugació com la del punt 1.
5. S'afegeix 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml).
6. Finalment s'afegeixen 2 unitats (1 $\mu$ l), de l'enzim Klenow.
7. El volum final de la reacció és de 20  $\mu$ l, la reacció es du a terme durant 1 hora a 37°C.
8. Mentre la reacció té lloc, es prepara la cromatografia d'exclusió. Es buida el contingut de la columna Sephadex G50 (s'obre primer per dalt i després per sota; per tancar es tanca primer per sota i després per dalt), i s'equilibra després amb 5 ml d'STE. Es tanca fins a la seva utilització.
9. Es tallen 6 trossos de paper Whatmann 3MM d'1,5 \* 1 cm<sup>2</sup> i es retolen amb números del 0 fins al 7. Es preparen també 7 macrovials amb 5 ml de líquid d'escintil·lació, retolats també del 0 fins al 7.
10. Un cop ha finalitzat la reacció s'afegeixen 180  $\mu$ l d'STE als 20  $\mu$ l de la barreja de reacció i es treuen 2  $\mu$ l que es dipositen sobre el paper Whatmann retolat amb el 0 (per determinar els comptes totals). Els 198  $\mu$ l restants es dipositen sobre la columna i s'afegeixen 200  $\mu$ l més d'STE que s'utilitzen per rentar l'eppendorf. La primera fracció consisteix en aquests primers 400  $\mu$ l. Les següents fraccions es recullen a partir de volums d'elució de 200  $\mu$ l d'STE fins a un total de 6 fraccions. De cadascuna d'elles s'extreuen 2  $\mu$ l i es dipositen al paper corresponent.
11. Les fraccions que contenen la sonda marcada són la núm. 2 i la núm. 3. El perfil de l'elució es fa per comptatge en escintil·lació líquida de la radiació  $\beta$  emesa en un comptador de radiació  $\beta$ , així també es pot fer una estimació de la incorporació aconseguida (normalment, en el nostre cas, del 35 al 40%) i permet quantificar els milions de cpm/ml (aquesta dada és necessària per a la hibridació). El perfil de l'elució també podia monitoritzar-se amb un comptador Geiger.



## 2.15 TRACTAMENT DEL DNA AMB KLENOW

El tractament del DNA amb el fragment de la polimerasa Klenow té la finalitat de fer que un extrem protuberant, que es forma en digerir el DNA amb un enzim de restricció, es converteixi en un extrem rom. Aquest tractament pot permetre lligar fragments de DNA que no eren cohesius.

Si l'extrem que deixa l'enzim de restricció és 3' protuberant, s'afegeixen els 4 dNTP a una concentració entre 0.25 i 1 mM, 1 µl de l'enzim Klenow directament a la reacció de restricció, ja que el tampó de tots els enzims de restricció permet l'acció d'aquesta polimerasa. El temps de reacció sol ser de 30 minuts. En canvi, si l'extrem és 5' protuberant, únicament s'afegeix un nucleòtid de l'extrem 3', complementari a l'últim nucleòtid de l'extrem 5', a la mateixa concentració esmentada anteriorment. Així, el fragment Klenow eliminarà els nucleòtids de l'extrem 3' amb la seva activitat de 3'-5'-exonucleasa, fins a arribar a aquest nucleòtid on actuarà amb la seva activitat de polimerasa. Aquest tractament també rel el nom de *polishing*.

## 2.16 TRACTAMENT DEL DNA AMB FOSFATASA ALCALINA

Aquest tractament té com a objectiu treure els grups 5' fosfat del DNA. Com que la lligasa necessita extrems 5'-fosfat aquest DNA no es pot relligar. Fent això reduïm el nombre de colònies en estratègies de clonació d'un insert dins d'un vector causats per la relligació d'aquest últim.

La fosfatasa alcalina porta el seu propi tampó (això depèn de la casa comercial, NEB funciona amb els tampons dels enzims de restricció). Això fa que sigui necessari un pas previ de precipitació del DNA per eliminar les sals del tampó anterior. Típicament, en un volum final de 50 µl, s'afegeixen 5 µl del tampó de la fosfatasa (x10) i 3 µl de l'enzim i es deixa incubant durant 2-3 hores a 37°C.

## 2.17 LLIGAMENTS

La reacció catalitzada per l'enzim T4-DNA lligasa consisteix en la formació d'un enllaç fosfodièster entre l'extrem 5'-fosfat i el 3'-hidroxil en DNA de doble cadena. Aquesta reacció finalment es transforma en bacteris competents, on es posen diferents controls. De forma òptima, hi ha diferents controls: el control del vector sense insert (control negatiu de lligament), el control positiu (una quantitat coneguda i baixa de DNA) i el control negatiu (sense DNA) de transformació, un control positiu de lligament on es posa, per exemple, un plasmidi tallat amb un enzim cohesiu i es comprova el funcionament de l'enzim. Una reacció de lligament té èxit, en principi, quan tenim moltes més colònies en el lligament que en el control negatiu de lligament i no tenim cap colònia en el control negatiu de transformació.

Segons la meua experiència hi ha alguns factors que afavoreixen l'èxit d'aquesta reacció: a) la qualitat i quantitat del DNA que es posa en la reacció (quan parlem de qualitat penso en el fet que el DNA no hagi estat molt en contacte amb llum ultraviolada i la presència o absència de restes de sals, agarosa, etc. que puguin

quedar en el DNA; en considerar la quantitat hem d'intentar ser intel·ligents en el procés d'obtenció dels dos fragments que es lligaran per tenir la quantitat màxima possible); *b*) forma dels extrems (sempre és molt més fàcil treballar amb extrems cohesius > extrem cohesiu-extrem rom > extrems roms; en aquest últim cas, l'adició de PEG pot incrementar l'eficiència ja que redueix l'aigua efectiva); *c*) relació molar entre el fragment i l'insert (sempre hi ha una relació òptima entre els dos fragments que s'han lligat, relació que depèn de cada cas); *d*) grau de fosforilació residual del vector (és recomenable incrementar el temps de tractament amb fosfatasa alcalina; després s'ha d'extreure el DNA, ja que la fosfatasa pot inhibir la reacció); *e*) mètode de transformació (com més eficient és aquesta reacció, tenim més possibilitats que les poques molècules que s'hagin lligat donin colònies resistents a l'antibiòtic).

Crec que els punts més importants són els punts *a*, *b*, *d* i *e*. Normalment la reacció es fa en un volum final de 10 µl, on s'afegeix 1 µl del tampó, 1 µl de l'enzim, 1 µl del vector, 3-5 µl de l'insert i aigua fins a 10 µl. S'incuba O/N o durant 4-5 hores a 16-17°C.

## 2.18 MUTAGÈNESI DIRIGIDA

### 2.18.1 MÈTODE DE KUNKEL

El procediment utilitzat es basa en Kunkel *et al.*, (1987) i en l'equip de BIO-RAD (Muta-gene<sup>TM</sup> Phagemid *in vitro* mutagenesis).

El mètode es basa en la transformació del plasmidi que conté el DNA a mutagenitzar en la soca bacteriana CJ236. Aquesta soca porta les mutacions *dut* i *ung* que ocasionen que el DNA de doble cadena dins d'aquests bacteris contingui uracils. S'obté DNA de cadena senzilla amb uracils, del nostre plasmidi. Aquest DNA de cadena senzilla s'anella amb l'oligonucleòtid de mutagènesi i es fa la síntesi *in vitro* de l'altra cadena. El nou plasmidi format així té una cadena amb uracils (la no mutagènica) i una altra sense uracils (la que conté la mutació que volem introduir). La cadena mutagènica té, així, un ventatge selectiu sobre l'altra cadena a l'hora de replicar-se en un hoste bacterià salvatge pels gens *dut* i *ung*. Així, el rendiment d'obtenció de mutants puja en teoria fins a un 80%, encara que nosaltres mai hem obtingut experimentalment més d'un 30% de rendiment de mutants.

Per obtenir el DNA de cadena senzilla s'empra el fag *helper* M13KO7. Aquest fag és parcialment defectiu en el procés de la seva pròpia replicació, i permet que s'obtingui més DNA de cadena senzilla provinent del nostre plasmidi que del mateix fag. Això s'aconsegueix inserint el gen de resistència a kanamicina en el DNA del fag, de manera que la presència de kanamicina selecciona les cèl·lules infectades amb el fag *helper*.

#### 2.18.1.a Procediment

- Obtenció de DNA de cadena senzilla del plasmidi pSPORT-1 que conté la seqüència d'rBAT humà.

Un cop transformat pSPORT-1 amb rBAT humà i obtingudes colònies, es pica una colònia i s'inocula (a primera hora del matí) en 50 ml de 2x YT (com el medi LB però amb el doble d'extracte de llevat i amb 1.6 vegades de bactotripton) amb cloramfenicol (fins a 30 µg/ml) i ampil·lina (fins a 50 µg/ml) (el primer selecciona les cèl·lules CJ236 i la segona selecciona aquelles que porten el plasmidi pSPORT-

1). Es deixa a 37°C amb agitació unes 10 h. Després es pren 1 ml del cultiu ja saturat i s'afegeix a 100 ml de 2x YT (+ cloramfenicol i ampicil·lina + 4 µl d'uridina a 10 mg/ml). S'incuba a 37°C amb agitació durant 1 h.

S'afegeix la quantitat de fag necessària per obtenir una multiplicitat d'infecció d'aproximadament 20 fags per cèl·lula. Per fer això s'ha de conèixer prèviament el nombre de cèl·lules del cultiu i el títol del fag. S'incuba durant 1 h més a 37°C amb agitació. Després de l'hora s'afegeixen 140 µl de kanamicina (concentració de l'estoc: 50 mg/ml), i es deixa créixer el cultiu tota la nit amb agitació a 37°C.

Es centrifuga a 6000 rpm durant 10 min, per precipitar els bacteris. Els fags amb el DNA de cadena senzilla són al sobrenedant. Aquesta centrifugació es repeteix les vegades necessàries fins que no queda res en suspensió (cap bacteri al sobrenedant). Els fags es precipiten afegint 25 ml de solució 5xPEG (solució filtrada, 15% polietilenglicol (PEG) 8000, 14.6% NaCl) i deixant-ho 15 min a temperatura ambient. Els fags per centrifugació es precipiten a 6000 rpm durant 15 min, i es resuspenen en 1 ml de TE. La solució obtinguda es passa a un eppendorf.

Els fags es reprecipiten de la manera següent: una centrifugació a velocitat màxima durant 5 min a 4°C. Al sobrenedant se li afegeix 250 ml de 5xPEG. Es deixa a temperatura ambient 15 min i es fa una nova centrifugació com l'anterior per precipitar els fags. El pellet es resuspèn en 300 µl de TE que contenia 100 µg d'RNAasa A. Es deixa que actuï l'enzim a temperatura ambient durant 10 min. Aquest pas és important, ja que permet eliminar restes d'RNA, que podrien després interferir la reacció d'anellament.

Els passos següents estan destinats a aïllar el DNA de cadena senzilla i treure les proteïnes del fag. Primer, es fa una extracció amb fenol, seguida d'una amb cloroform, una altra amb fenol, i de nou una amb cloroform. L'última extracció amb cloroform es repeteix tants cops com sigui necessari fins que no es vegi cap interfase (proteïnes).

Seguidament el DNA de cadena senzilla ja aïllat es precipita amb acetat sòdic 0.3 M final i 2.5 volums d'etanol absolut. Es deixa almenys durant 3 h a -80°C, es centrifuga a màxima velocitat, es renta el precipitat 2 cops amb etanol al 70% i es resuspèn en TE. Una part alíquota s'empra per observar el DNA en un gel d'agarosa i una altra per quantificar-lo mesurant la DO a 260 nm.

- Anellament de l'oligonucleòtid amb el DNA de cadena senzilla

L'anellament es va fer de tal forma que la relació molar de l'oligonucleòtid i el DNA de cadena senzilla fos de 20:1, i es va realitzar de la manera següent:

2 µl de DNA de cadena senzilla

2.4 µl de tampó 5x de seqüenasa (el tampó de la polimerasa que s'utilitzava posteriorment)

5 µl d'oligonucleòtid (5 ng)

2.6 µl d'aigua

La barreja es posava a 70 °C durant 5 min per permetre la desnaturalització del DNA i, per tant, que es desfacin possibles estructures secundàries, i per a permetre l'anellament es deixa baixar la temperatura lentament (aproximadament 1°C/min) fins a 40°C.

- Obtenció de la segona cadena *in vitro*

Als 12 µl de l'anellament s'afegia el següent:

2 µl d'una barreja de desoxiribonucleòtids, 5 mM

2 µl d'ATP 10 mM

2 µl d'aigua

1 µl de lligasa T4 (3 unitats)

1 µl de seqüenasa (1.6 unitats)

Es deixa en gel durant 5 min, després 5 min a temperatura ambient i es procedeix a la polimerització a 37°C durant 90 min. Finalment s'afegeixen 80 µl de TE.

20 µl de la barreja es transformen en una soca bacteriana (DH5α) normal per *dut* i *ung*. Les colònies obtingudes es van analitzar per PCR per esbrinar si eren mutades, i d'aquelles que ho eren es va seqüenciar el casset entre dues dianes de restricció úniques per verificar que la seqüenasa no havia introduït errors addicionals en la seqüència. Aquest casset es lliga després al plasmidi original d'on s'hav tret aquest mateix casset.

### 2.18.2 KIT DE STRATAGENE

Hem observat que aquest mètode és molt més eficient que el mètode de Kunkel i també més ràpid, ja que no requereix el pas previ d'obtenció de cadena simple. Es basa a fer servir un enzim de restricció, DpnI, que talla el DNA quan està metilat: així, les cadenes sintetitzades *in vitro* seran resistents a l'acció d'aquest enzim.

Un exemple típic d'aquesta reacció seria el següent:

	10 ng DNA	50 ng DNA
Tampó	5 µl	5 µl
DNA (5 ng/ml)	2 µl	10 µl
Oligo <i>sense</i> (125 ng)	2.7 µl	2.7 µl
Oligo <i>antisense</i> (125 ng)	1.6 µl	1.6 µl
Mix dNTPs	1 µl	1 µl
Aigua	37.7 µl	29.7 µl

Una vegada preparat cada tub, afegim oli de PCR i fem un procés de *Hot Start*, incubant cada tub 4 minuts a 95°C, després es deixa a 90°C, i es col·loca 1 µl de la polimerasa Pfu (que presenta correcció de lectura, *proofreading*).

Es fan 16 cicles de 95°C durant 30 segons, de 65°C durant 30 segons i de 68°C durant 13 minuts i 30 segons. La temperatura d'anellament (65°C en aquest cas) es pot modificar segons la mutació en qüestió, així com el temps d'extensió, segons la longitud del plasmidi.

S'afegeix seguidament 1 µl de l'enzim DpnI i es posa la reacció a 37°C tota la nit, per afavorir la destrucció de les cadenes parentals. Finalment aquesta reacció es transforma en una soca bacteriana. El procés a seguir per a l'anàlisi i construcció final dels mutants és el mateix que s'ha descrit en l'apartat anterior.

## 2.19 PCR

Es basa en l'amplificació selectiva *in vitro* de regions específiques de DNA (Saiki *et al.*, 1988). Consisteix en cicles successius de desnaturalització de la doble cadena, hibridació amb oligonucleòtids encebadors de cadena sencilla i complementaris en seqüència als extrems del fragment que volem amplificar, i extensió de les cadenes d'oligonucleòtids mitjançant l'acció de la *Taq* polimerasa. En cada cicle de desnaturalització, hibridació i extensió es dobla, idealment, el nombre de còpies del fragment en qüestió. Aquesta amplificació exponencial fa que siguin necessàries poques còpies inicials de la zona que es vol amplificar, això en facilita enormement l'estudi.

Potser, una de les grans limitacions d'aquesta tècnica, rau en el fet que els fragments que normalment es poden amplificar no excedeixen de les 4 kb, no obstant això, actualment hi ha modificacions del protocol bàsic que permeten amplificacions de fragments de fins a 30 kb mitjançant l'ús d'altres polimerases termoestables.

Cada fragment de DNA que volem amplificar té una de les característiques que determinen les condicions específiques d'ampliació. Cal doncs, optimitzar les condicions per a cada fragment en particular. Les condicions més generals son les que expliquem tot seguit:

### 2.19.1 PROCEDIMENT

- Dins un tub, es barregen els diferents components de manera que quedin unes concentracions finals de 200  $\mu$ M de dNTPs; 600 nM de cada oligonucleòtid; 50 mM de KCl; 10 mM de Tris, pH 8.3; 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.01% de gelatina (Sigma G-2500). S'afegeixen 5 ng/ $\mu$ l de DNA i 0.02 unitats de *Taq* polimerasa/ $\mu$ l. Es cobreix amb una gota d'oli mineral per evitar evaporacions.

En reaccions de PCR de més d'un tub, es prepara una barreja general que després es repartirà entre els diferents tubs. La manera més pràctica de procedir que he trobat consisteix a posar l'oli el en tub abans de tot, després els components que siguin exclusius de cada tub menys el DNA, finalment el DNA, i després la part alíquota de barreja general posada al tap, de manera que podrem veure si ens hem quedat curts de barreja (signe d'equivocació) en repartir-ho en tots els tubs, però sense barrejar-ho amb els components exclusius. Finalment, es tapa el tub amb cura, s'agita bé, i se centrifuga breument.

L'amplificació exponencial fa que s'hagi de tenir molta cura per tal d'evitar possibles contaminacions. Idealment, els productes de l'amplificació haurien d'analitzar-se en un lloc físicament llunyà al lloc on es munten les PCR, i les pipetes emprades en muntar la PCR haurien de ser diferents a les utilitzades en altres experiments, especialment a les utilitzades en la manipulació de plasmidis i productes finals de PCR. També, abans de començar a utilitzar un nou oligonucleòtid, hauria d'aliquotar-se la dilució mare, i fer diverses parts alíquotes a la concentració de treball. La resta de components de la PCR també hauria d'estar en petites parts alíquotes de manera que si es detectés contaminació, es podria llançar i començar de nou amb productes no contaminats. El volum final de cada PCR dependrà de la seva finalitat. Si només volem veure si hi ha o no amplificació, n'hi

ha prou amb 10 µl, ja que, en gels de pous fins i estrets, hi caben i es veuen bé 5 µl de PCR. Si es per digerir, 15-20 µl son prou, 4 µl per comprovar que hi ha hagut amplificació i la resta per a la digestió.

- Es posen els tubs dins els forats d'un bloc tèrmic. Les condicions de temperatura de la màquina de PCR on aniran els tubs han de ser les següents, generalment:

- Inicialment 3 min a 95°C.
- Posteriorment es fan 35 cicles de:
  - Desnaturalització: 30 s a 95°C
  - Hibridació: 30 s a 46-62°C
  - Extensió: 30 s-4 min a 74°C
- Finalment es deixa 5 min a 74°C
- Refredar-ho a temperatura ambient.

### 2.19.2 REACTIUS

- DNA polimerasa termoestable: la polimerasa més utilitzada és la que procedeix del bacteri *Thermophilus aquaticus*. Aquesta pot resistir bé temperatures de més de 90°C, amb una vida mitja de 2 hores a 92°C i de 40 min a 95°C. Polimerases recombinants basades en aquesta *Taq* poden tenir diferents vides mitjanes superiors i més fidelitat. L'activitat de polimerasa es màxima a 74°C, encara que mantingui també aquesta activitat dins un ampli ventall de temperatures.

- Oligonucleòtids: constitueixen un factor clau en l'èxit de la PCR. Hi ha una sèrie de criteris per intentar dissenyar oligonucleòtids amb un màxim de garantia d'èxit, encara que no sempre funcionen, i alhora, oligonucleòtids que amb prou feines compleixen aquests criteris poden funcionar molt bé. Els criteris són els següents: *a)* Nombre d'A + T i C + G semblant; *b)* extrem 5' o zona central amb energia lliure de Gibbs molt negativa (ens assegurem així una unió molt forta) i extrem 3' amb energia lliure de Gibbs menys negativa (assegurem així una unió específica, ja que la desestabilització provocada per un nucleòtid no aparellat podrà provocar la no-unió de l'oligonucleòtid); *c)* existència d'una G o una C en l'extrem més 3' ja que en ser la unió G-C molt estable, es facilitarà que la *Taq* polimerasa iniciï la seva funció; *d)* evitar oligonucleòtids que poden formar estructures internes estables a la temperatura a la qual s'hagin d'utilitzar (55°C generalment), o que presenten seqüències complementàries que permeten la formació de dímers, especialment si aquests són d'una estructura tal que deixin extrems 5' protuberants, ja que els extrems 3' poden ser utilitzats com a encebadors i allargar-se les cadenes. Hi ha diferents programes informàtics que faciliten la recerca d'oligonucleòtids que compleixin aquests criteris. En de la present tesi, s'ha utilitzat el programa OLIGO 4 per dissenyar la majoria dels utilitzats.

- Tampó de PCR: El pH òptim per a la *Taq* polimerasa és de 7.0-7.5 a 74°C. Normalment s'utilitza un tampó Tris-HCl de pH 8.5-9.0 a 25°C, ja que el pH del Tris disminueix 0.03 unitats per cada °C d'increment de temperatura.

- Detergents. La *Taq* polimerasa és una proteïna molt hidrofòbica que té tendència a precipitar en solucions aquoses. L'addició de detergents no iònics com ara el Tritó X-100 o el Tween-20 a concentracions finals del 0.01% ajuda perquè es mantingui tota l'activitat en la reacció d'amplificació.



A partir del protocol bàsic utilitzat, els components que poden variar dins una determinada amplificació són els següents:

- Concentració de  $MgCl_2$ . Com més gran sigui la concentració de  $MgCl_2$  més fàcil serà la unió de l'oligonucleòtid al DNA motlle. Per un costat, això pot augmentar l'eficiència de la PCR, però, per l'altre costat, pot facilitar les hibridacions no totalment específiques, la qual cosa provocaria l'amplificació de fragments no desitjats. Les concentracions de  $MgCl_2$  han variat des d'1 mM fins a 3 mM.
- Temperatura d'hibridació de l'oligonucleòtid. La temperatura d'hibridació depèn de la seqüència de l'oligonucleòtid i es calcula (en °C) mitjançant la fórmula:  $T_m = [4(G + C) + 2(A + T)] - 4$ . En el cas que l'oligonucleòtid no sigui totalment complementari al DNA, la temperatura d'hibridació es redueix per facilitar una unió no totalment específica.
- Temps d'extensió a 74 °C. Depèn de la longitud del fragment per amplificar i es calcula segons la relació aproximada d'1.5 Kb esteses per minut.
- Dependent de l'amplificació, el volum final de PCR varia.

### 2.19.3 MÈTODE SOE (*GENE SPLICING BY OVERLAP EXTENSION*)

Aquest mètode, desenvolupat per Horton *et al.*, (1987) consisteix a fer dues PCR fent servir oligonucleòtids que tenen la zona 5' diferent del tros de DNA que s'està amplificant de la primera PCR, però complementària a la de l'extrem 5' de la segona PCR. Vaig fer servir aquest mètode per construir quimeres entre els cDNA de 4F2hc i rBAT (vegeu "Resultats i discussió", apartat 5).

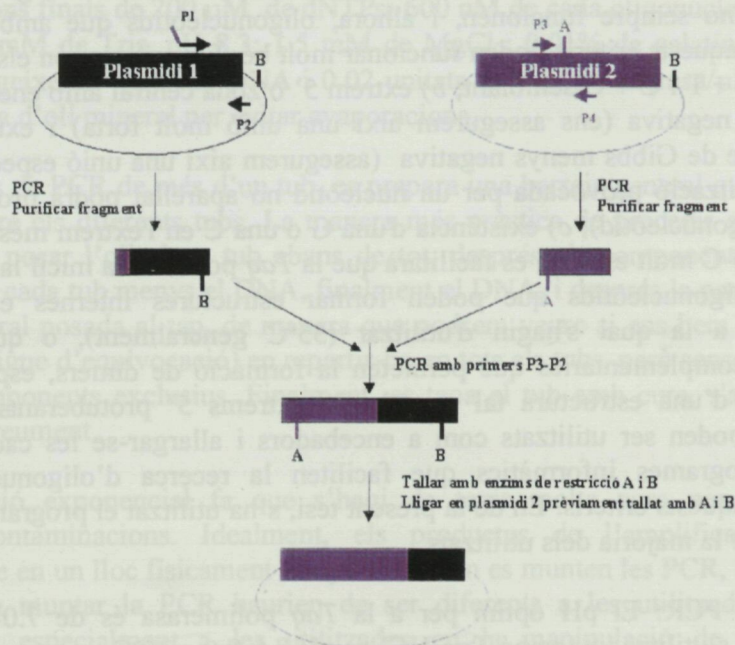


Figura 10: Esquema gràfic del mètode SOE.