

ANNEXES A MATERIAL i METODEDES.

Annex I. Tinció amb Ulex-europaeus I.

- Desparafinització.
- Bloqueig de la peroxidasa endògena mitjançant incubació durant 30 minuts en solució de peròxid d'hidrògen al 3%.
- Tractament amb saponina al 0.05% durant 30 minuts.
- Incubació en sèrum de conill durant 30 minuts, a temperatura ambient, amb una dilució de 1:5.
- Incubació en Ulex europaeus I (Dako A/S Denmark code nº X 921) durant 30 minuts, a temperatura ambient, amb una dilució de 1:100.
- Incubació amb Anticos secundari de conill anti-Ulex europaeus durant 30 minuts, a temperatura ambient, amb una dilució de 1:50.
- Incubació amb el complex de avidina-biotina durant 40 minuts, amb una proporció 1/25 d'acord amb les instruccions del fabricant (Vector, Burlingawe, CA).
- Revelat amb diaminobenzidina.
- Muntatge de les laminetes.

Annex II: Tinció immunohistoquímica per al VEGF.

- Desparafinització.
- Bloqueig de la peroxidasa endògena mitjançant incubació durant 30 minuts en aigua oxigenada al 3%.
- Escalfament amb microones durant 8 minuts.
- Incubació amb sèrum "normal" goat durant 45 minuts amb una dilució de 1:10 amb PBS 1x per al bloqueig de les unions inespecífiques.
- Incubació amb l'Anticòs primari anti-VEGF amb una dilució 1:1000 durant 12-24 hores, a 4° C.
- Incubació amb l'Anticòs secundari de conill anti-goat biotinilat, amb una dilució 1:125, durant 40 minuts.
- Incubació amb el complex de avidina-biotina durant 40 minuts, amb una proporció 1/25 d'acord amb les instruccions del fabricant (Vector, Burlingame, CA).
- Revelat amb el cromògen "fast red" (Biogenex Inc., USA) i contratinció amb hematoxilina de Mayer.
- Muntatge de les laminetes.

Annex III: Tinció immunohistoquímica dels vasos sanguinis dels ratolins amb Factor VIII (von Willebrand).

- Desparafinització.
- Bloqueig de la peroxidasa endògena amb peròxid d'hidrògen al 2% i metanol al 30% durant 15 minuts.
- Digestió amb proteinasa-k (a 0.7 mg/ml) a 37° C durant 15 minuts.
- Incubació amb sèrum goat dissolt 1:5 amb PBS 1x durant 2 hores o més a temperatura ambient.
- Incubació amb l'Anticos primari (Dako) dissolt 1:75 durant 12-24 hores a 4° C.
- Incubació amb l'Anticos secundari anti-rabbit (Vectastain) biotinitat i conjugat amb peroxidasa dissolt 1:200 durant 45 minuts a temperatura ambient.
- Incubació amb Avidina-Biotina Complex dissolt 1:100 durant 45 minuts a temperatura ambient.
- Revelat amb diaminobenzidina.
- Muntatge de les laminetes.

Annex IV: Reaccions de digestió i lligació de nucleòtids.

* Esquema reacció de digestió:

5 µl plàsmid
1 µl enzim de restricció
1 µl de tampó 10x corresponent a l'enzim de restricció
1 µl BSA 10%
2 µl H₂O

Total: 10 µl

incubació tota la nit (overnight) a 37°C.

L'endemà es corre el resultat de la digestió en un gel d'agarosa per comprovar que hagi estat correcta.

La concentració del plàsmid és la que determina la quantitat d'enzim, normalment per a 1 µgr de DNA posem de 2 a 4 unitats d'enzim.

La quantitat de DNA a emprar a cada digestió és aproximadament de 10 µgr.

La concentració de DNA que tenim la determinem a partir de l'absorbància mesurada amb l'espectrofotòmetre.

* Esquema reacció de lligació:

10 µl insert (fragment que porta el cDNA del VEGF)
2 µl vector
2 µl tampó 10x
1 µl lligasa
4 µl H₂O

Total: 20 µl

Es deixa overnight a 16°C

L'endemà es corre la lligació en un gel d'agarosa per comprovar que hagi estat adequada.

Annex V: Transformació dels bacteris.

Consisteix en la introducció dintre els bacteris del plàsmid que ens interessa.

- creixement overnight a 37°C la colònia seleccionada (en 20 ml de medi LB afegim 500 µl de bacteris) fins a una Densitat Òptica de 0.5 amb el filtre de 600 nm a l'espectrofotòmetre, per tal d'evitar que estiguin sobrecrecuts.

- centrifuga a 2500 g 5 minuts a Temperatura Ambient (TA).

- es resuspen el pellet amb CaCl₂ 50 mM fins arribar a la meitat del volum inicial, o sia 10 ml.

- incubació 30 minuts en gel.

En aquest punt, els bacteris són COMPETENTS.

Si interessa, aquests bacteris competents es poden conservar a -80°C, i utilitzar-los posteriorment per fabricar grans quantitats de plàsmid.

- centrifugació a 2500 g 5 minuts a 4°C

- resuspenió amb 1/10 del volum inicial (2 ml) de CaCl₂ 50 mM fred.

- en un eppendorf estèril afegir 0.1 µgr del plàsmid amb el vector (cDNA del VEGF en sentit o en antisentit) + 200 µl de bacteris competents.

- igualment en un altre eppendorf estèril afegir 0.1 µgr del plàsmid sense el vector + 200 µl de bacteris competents.

- en un tercer eppendorf estèril, 0.1 µgr de plàsmid linialitzat sense el vector + 200 µl de bacteris competents.

- en un quart, 200 µl de bacteris competents.

- incubació en gel 30 minuts.

- xoc tèrmic a 42°C 2 minuts o a 37°C 5 minuts.

- afegir 1 ml de LB.

- creixement durant 45 minuts a 37°C en agitació.

- en plaques amb tres antibiòtics diferents (a les concentracions: ampicil.lina, 30µgr/ml; tetraciclina, 7.5 µgr/ml; i kanamicina, 40 µgr/ml) es sembren bacteris transformats (20-40 µl) i com a control negatiu bacteris competents no transformats.

- incubació overnight a 37°C.

Annex VI: Extracció del plàsmid a partir del cultiu de bacteris transformats.

Es realitza segons el protocol comercial de Promega Technical Bulletin, "Magic™ minipreps DNA purification systems".

El seu objectiu és aïllar el DNA plasmídic dels bacteris, per processar-lo / analitzar-lo / obtenir-lo en suficients quantitats per transfectar-lo.

- volum de E. coli: 22.5 ml
- centrifugació a 13000 rpm 15 segons
- rebutjar el sobrenedant
- afegir 500 µl de solució I del protocol per resuspendre el pellet
- afegir 500 µl de solució II de lisi
- invertir l'eppendorf fins que la solució es torna clara
- afegir 500 µl de solució III per precipitar els residus cel.lulars de la lisi i aturar-la
- centrifugació 5 minuts a 13000 rpm
- repartir el sobrenedant en 15 eppendorfs més, 500 µl a cada eppendorf
- afegir 0.7 volums d'isopropanol (0.7 x 500 = 350 µl)
- vortejar
- esperar a TA 10 minuts fins que precipiti
- centrifugació 10 minuts a 13000 rpm
- rebutjar el sobrenedant
- resuspendre el pellet de 3 eppendorfs en un volum de 500 µl de SephaglasTM FP
- centrifugació 15 segons a 13000 rpm
- rebutjar el sobrenedant
- resuspensió amb 500 µl de wash solution
- centrifugació 15 segons a 13000 rpm
- rebutjar el sobrenedant
- resuspensió amb 500 µl etanol 70°
- centrifugació 15 segons a 13000 rpm
- rebutjar el sobrenedant
- vortejar el pellet
- eixugar molt bé, 10 minuts a TA
- resuspendre tots els pellets amb 200 µl de H₂O
- 5 minuts a TA
- centrifugació 15 segons a 13000 rpm
- recuperar el sobrenedant, que és el que té el plàsmid

- congelar amb nitrògen líquid
- centrifugar 15 minuts a 13000 rpm
- rebutjar el sobrenedant
- resuspendre amb 100 µl etanol 70°
- centrifugar 10 minuts a 13000 rpm
- rebutjar el sobrenedant
- resuspendre en H₂O

Annex VII: Protocol de seqüenciació.

* Protocol (Ampli Cycle™ sequencing kit - Perkin Elmer):

1.- Per a cada mostra de DNA a mesurar, es preparen 30 µl de mescla de reacció:

- 1 µl primers 20 µM (SP6, T7)
- 4 µl cycling mix
- 1 µl dATP* marcada amb ³²P
- 1 µl plàsmid
- H₂O, fins a 30 µl
- Total: 30 µl

2.- A cada tub, posar:

- 2 µl ddNTP
- 6 µl de mescla de reacció
- 1 gota d'oli

3.- Introduir els tubs a la màquina de PCR, on es programa el següent cicle:

- 30 minuts a 95°C (desnaturalització)
- 1 minut a 94°C (desnaturalització)
- 45 segons a 60°C (unió dels primers)
- 1 minut a 72°C (elongació)
- tornar al punt 2, i fer el cicle 29 vegades
- 5 minuts a 72°C
- a 16°C, indefinidament

Quan s'acaba la reacció a la màquina termocicladora, aturar amb un buffer stop: si hi ha 8 µl de mostra, afegir 4 µl de stop solution, bullir les mostres durant 3 minuts, i després carregar en el gel 1 ó 1.5 µl.

4.- Gel per córrer la seqüenciació: gel denaturalitzant amb acrilamida i urea:

- 51 ml TBE 1.2x + 9.4 M Urea
- 9 ml acrilamida ibis 40%
- Total: 60 ml
 - Afegir 600 µl AMPs 10%
 - Afegir 25 µl TEMED

Carregar les mostres, cada dNTP en un pou, generalment en el següent ordre: G A T C.

Una correguda d'una hora i 48 minuts a 55 V deixarà llegir si tot va bé el primer tros de la seqüència i aproximadament 100 nucleòtids.

Deixar refredar el gel. Es fixa amb solució fixadora (300 ml metanol + 2400 ml aigua destilada + 300 ml àcid acètic glacial), submergit almenys 30 minuts.

Retirar el gel de la solució fixadora i assecar, primer amb un plàstic, encabat amb paper whatman^R i finalment aplicant-li el buit 30-60 minuts.

Revelar, aplicant el gel directament junt la pel·lícula.

Annex VIII: Cultius de les línies tumorals de melanoma.

Les dues línies de melanoma emprades són la A375P i la A375MM. La línia A375P (ATCC CRL 1619) és obtinguda a partir d'un melanoma humà. La línia A375MM és obtinguda a partir de la A375P, i té un major potencial metastàtic. Ambdues línies creixen *in vitro* de forma adherent al terra dels flascons, adoptant les cèl.lules una morfologia fusocel.lular.

El medi emprat per als cultius cel.lulars està compost de:

- 50% DMEM
- 50% HAM'S 12
- 1 mM piruvat
- 4 mM glutamina
- FSC (Fetal Serum Calf o sèrum boví fetal), a la concentració:
 - 10% al medi de creixement normal
 - 20% al medi usat per congelar i descongelar

Es conserva a 4°C

Prèviament, s'ha comprovat la seva esterilitat deixant-lo 36 hores a 37°C al bany maria.

La glutamina, el piruvat i el FSC es filtren prèviament amb un filtre GS.

Habitualment, les cèl.lules són congelades. Per descongelar-les:

- bany de 37°C
 - afegir 12 ml de medi de cultiu fred 20% FSC per a cada ml de cèl.lules. Aquest medi de cultiu ha d'estar fred (4°C, per tant mantingut en gel) i s'ha d'anar afegint lentament, doblant el volum i prou cada vegada que se n'hi afegeix.
 - centrifugar 10 minuts a 1000 rpm a 4°C
 - cultiu amb 5 ml de medi 10% FSC en un flascó T25 en una estufa de 37°C amb una concentració de CO₂ del 5% en atmòsfera saturada d'aigua (T25 vol dir 25 cm², i T75 vol dir 75 cm²).
 - controlar en unes hores amb microscopi òptic. Si les cèl.lules són rodones i refringents vol dir que són vives.
 - quan es comprova que creixen adequadament, fer 2 nous flascons T25 a partir del primer, amb medi 10% FSC.
- Quan creixen correctament, comencen a quedar enganxades al terra, i deixen de ser rodones per ser fusocel.lulars.

Cal canviar el medi de cultiu quan el pH d'aquest s'acidifica. Això queda indicat per un canvi colorimètric de roig a groc, degut a què conté roig-fenol, que vira a groc quan el pH baixa.

Quan en un flascó de medi de cultiu hi ha massa cèl.lules (confluents), cal generar dos nous flascons a partir d'aquest per separar les cèl.lules. El procés es fa afegint tripsina. El nombre de passes que fem als cultius ve definit per les vegades que tripsinitzem.

Per tripsinitzar, es neteja inicialment el flascó amb PBS 1x. Es recull i rebutja el PBS 1x. S'afegeix una determinada

quantitat de tripsina escalfada a 37°C (4 ml als flascons T75, 2 ml als flascons T25) al flascó. S'incuba el flascó a 37°C fins que s'observa sota el microscopi que les cèl.lules estan rodones (desenganxades). Es dona un cop al flascó per a què es desenganxi la resta de les cèl.lules del terra, on estan adherides. Recollir el contingut en un tub. Introduir medi de cultiu al tub, com a mínim igual quantitat que de tripsina, per a què no morin les cèl.lules. Centrifugar 10 minuts a 1000 rpm a 4°C per separar la tripsina de les cèl.lules. Resuspendre el pellet cel.lular amb nou medi de cultiu, i estrenar un nou flascó T.

Arribarà un moment en què hi haurà el nombre desitjat de flascons d'un clon cel.lular, i caldrà llavors congelar les cèl.lules. Per congelar-les es fa amb medi de congelació, compost de 10% de DMSO (Dimetilsulfòxid) i 20% de FSC/SBF (Fetal Serum Calf / Sèrum Boví Fetal). Posar el medi de congelació amb les cèl.lules en una caixa (Nalgene^R Cryofreezing container) que porta isopropanol i la posem al congelador de -80°C; l'isopropanol aconsegueix que disminueixi 1°C per minut la temperatura, evitant una congelació massa ràpida. Es treu a les 4 hores, i es pot congelar llavors en Nitrògen líquid o conservar al congelador de -80°C fins a 2 mesos.

Annex IX: Protocol per a la transfecció del cDNA del VEGF en sentit i antisentit a les línies de melanoma humà A375P i A375MM mitjançant liposomes.

Hem seguit el protocol segons el fabricant (Lipofectamine™ Reagent, Life Technologies) per aconseguir una transfecció permanent sobre cultiu de cèl.lules adherents.

Agafar 7 plaques de 6 pous, i posar 1 ml de medi de cultiu a cada pou.

Posar a cada pou 2.5×10^6 cèl.lules de melanoma. El comptatge de cèl.lules de melanoma es realitza mitjançant recompte a la cambra de Neubauer, segons la següent fórmula:

$$\text{cèl / ml} = X \cdot \text{dilució} / 0.0001 \text{ ml}$$

on:

- X és la mitjana de comptatges als 4 camps
- dilució: la que s'hagi fet a l'omplir la cambra
- 0.0001 ml: és el volum de la cambra de Neubauer

Una vegada les cèl.lules estan adherides al terra del pou, rentar els pous amb PBS, posar 5 ml d'OPTI-MEM (és un medi de cultiu sense sèrum, és a dir, sense nutrients; amb aquest medi s'aconsegueix que estiguin metabòlicament quietes, sense morir), i deixar a 37°C unes 8 hores, que serà quan es practiqui la transfecció amb pRC/CMV, pRC/CMV/VEGF i pRC/CMV/ α VEGF.

Preparar per a la transfecció:

a) pRC/CMV (2 pous):

- A: 108 μ l pRC/CMV (147.2 μ gr/ml) + 292 μ l OPTIMEM
- B: 40 μ l lipofectamina + 360 μ l OPTIMEM

b) pRC/CMV/VEGF (2 pous):

- A: 10.4 μ l pRC/CMV/VEGF (1535 μ gr/ml) + 389.6 μ l OPTIMEM
- B: 40 μ l lipofectamina + 360 μ l OPTIMEM

c) pRC/CMV/ α VEGF (2 pous):

- A: 16.7 μ l pRC/CMV/ α VEGF (960 μ gr/ml) + 383.3 μ l OPTIMEM
- B: 40 μ l lipofectamina + 360 μ l OPTIMEM

d) Control negatiu (1 pou):

- A: 200 µl OPTIMEM
- B: 20 µl lipofectamina + 180 µl OPTIMEM

Totes les mescles es realitzen en tubs estèrils de poliestirè. Es preparen les mescles de DNA en un eppendorf estèril, i les de lipofectamina en un tub de poliestirè. Es mesclen les dues barreges en el tub de poliestirè amb el vortex durant 2 minuts. Es deixen a TA 30 minuts.

Els pous es renten una vegada més amb PBS, i es posen amb OPTIMEM nou (4 ml).

Afegir 400 µl de les mescles corresponents (A + B) a cada pou.

Deixar overnight a 37°C.

L'endemà, rentar els pous transfectats amb PBS, i posar medi normal 10% FSC per a què creixin les cèl.lules.

Al dia següent, canvi de medi i afegir genètica (500 µgr/ml), per a què creixin només aquelles cèl.lules que hagin integrat el plàsmid correctament (les cèl.lules de melanoma no sobreviuen en un medi de cultiu on hi hagi genètica, aquesta els és tòxica). Deixar creixent 9-10 dies, per seleccionar estrictament aquelles cèl.lules on la transfecció hagi estat permanent.

Annex X: Reacció de la cadena de la polimerasa – PCR.

Les temperatures de barreja o "melting" per als diferents encebadors o "primers" són: T7, 61°C; SP6, 57°C; F, 66°C; R2, 73°C. S'ha treballat a 62°C. El nombre de cicles serà entre 30 i 40, habitualment 35.

El DNA s'obté seguint el protocol inclòs a l'Annex XI.

* Mescla standard per fer la PCR:

- 18.3 µl H₂O (per assolir un volum de 25 µl)
- 2.5 µl dNTP
- 2.5 µl tampó 10x (que inclou MgCl₂ 1.5 mM)
- 0.25 µl primer 1
- 0.25 µl primer 2
- 0.2 µl TAQ
- Total: 24 µl
- + 1 µl mostra
- + gota d'oli, per a evitar que s'evapori

Es córre la PCR en un gel d'acrilamida al 6%, a 250 V.

A cada pouet del gel: 5 µl de la PCR i 1 µl de colorant LB 6x; el ladder guia emprat és el 174ΦHaeIII.

Annex XI: Protocol d'extracció del DNA.

Es parteix de cèl.lules de melanoma transfectades, que han estat congelades després de fer-les créixer en un medi amb geneticina.

- al "pellet" o precipitat cel.lular afegir 2 ml SET 1x i 40 µl de proteinasa k (proporció 50 a 1 per al SET 1x) i incubar habitualment overnight a 37°C.

- l'endemà, bullir RNAsa 10 minuts, i afegir a la mostra (aproximadament 3 vegades menys quantitat que proteinasa k). Incubar 1 hora com a mínim a 37°C.

- afegir NaCl 5 M en una quantitat similar a la de proteinasa k.

- 1 volum de fenol, vortex (fenol-cloroform, utilitat: separar el DNA de la resta)

- 10 minuts de centrifuga a 3000 rpm

- mig volum fenol + mig volum cloroform, vortex

- 20 minuts de centrifuga a 2500 rpm

- 1 volum cloroform

- 20 minuts de centrifuga 2500 rpm

- 2 volums etanol

- remenar fins que assoleixi un aspecte viscos ("medusa")

- guardar a -20°C overnight

- treure del congelador, l'endemà

- centrifugar mitja hora a 4°C

- treure l'etanol absolut

- immergir amb etanol 70°

- deixar que floti el DNA, perquè així es renta si hi ha sals, proteïnes....

- centrifugar mitja hora a 4°C

- treure l'etanol de 70°

- eixugar del tot

- resuspendre amb TE 1x, per exemple 200 µl, a TA.

- fer una dilució 1:200 amb H₂O

- mesurar la concentració de DNA detectant l'absorbància de la mostra a UV de 260 i 280 nm de longitud d'ona mitjançant un espectrofotòmetre. L'absorbància sobre els 260 nm marcarà la concentració de DNA en µgr/ml al

- multiplicar per 1000 el valor de la màquina. L'absorbància sobre els 280 nm serveix per veure si la mostra és bruta.

Annex XII: Southern blot.

- preparar un gel d'agarosa al 0.8% (2.44 gr agarosa + 304 ml TBE 1x).
- a cada pou posar entre 12.5 i 50 ng de DNA mostra + H₂O + LB 6x. Es calculen els mateixos ng de DNA per a totes les mostres; segons el volum necessari per aconseguir aquests ng, la resta omplir amb el LB 6x i l'H₂O tenint en compte que el LB ha de quedar finalment a 1x. Aquest DNA prèviament s'haurà digerit tal com s'indica a l'annex XI previ, doncs no és factible fer un Southern blot eficient amb el DNA cel·lular sencer.
- mitjançant electroforesi córrer el DNA pel gel d'agarosa amb els següents voltatges: 45 minuts a 100 V, 14 h a 35 V i 1.40 h a 80 V.
- tenyir el gel amb bromur d'etidi, que té afinitat per les bases nitrogenades, i fotografiar sota llum ultraviolada per localitzar les bandes.
- deixar el gel destenyint en aigua (destil·lada o aigua "mili Q") 1 hora i mitja.
- desnaturalitzar el DNA:
 - 10 minuts amb HCl 0.25M
 - rentada amb H₂O
 - 30 minuts amb solució denaturant A
 - 30 minuts amb solució denaturant A
 - 1 hora amb solució neutralitzant B
 - 30 minuts amb solució neutralitzant B
- Alternativament, per desnaturalitzar el DNA es pot fer afegint Na OH al SSC 10x de la cubeta amb la que es farà el blot.
- blot, overnight, o fins i tot un cap de setmana sencer: sobre una cubeta que conté SSC 10x col·locar un vidre, damunt el qual es posen per ordre paper whatman, el gel d'agarosa, una membrana de nylon mullada amb SSC 2x, 2 papers whatman mullats amb SSC 2x, un plec de mocadors de paper, un altre vidre, i un pes que ho sostingui, tot tapat amb un plàstic per evitar l'evaporació. L'únic contacte amb el SSC 10x és mitjançant els papers whatman que hi ha sota el gel d'agarosa, de manera que el SSC 10x pujarà per capil·laritat, arrossegant el DNA cap a la membrana de nylon, on restarà aturat.
- post-blot, fixar les membranes 1 minut i mig amb raigs ultraviolats (integren de forma estable i irreversible el DNA a la membrana de nylon), després de rentar una mica la membrana amb SSC 2x i eixugar a TA.
- tornar a rentar amb SSC 2x després dels ultraviolats.
- posar la membrana amb tampó de pre-hibridació
 - tampó de pre-hibridació:
 - 7.5 ml formamida 100%
 - 3.75 ml SSC 20x
 - 1.5 ml Denhardt's

- 2.25 ml H₂O

Total, 15 ml; filtrar amb un paper de filtre normal, resultant 13 ml

Afegir llavors 130 µl de DNA d'esperma de salmó bullit prèviament 5-10 minuts.

- incubar la membrana amb tampó de pre-hibridació durant 2 hores com a mínim a 42°C, al forn d'hibridació.

- Hibridació:

- tampó d'hibridació:

- 7.5 ml formamida 100%

- 3.75 ml SSC 20x

- 3 ml dextrà sulfat

- 300 µl Denhardt's

- 0.45 ml H₂O

Total, 15 ml; filtrar amb un paper de filtre normal.

- marcatge de la sonda de VEGF:

- la sonda s'obté a partir del plàsmid + l'insert que teniem conservat, després de digerir-lo amb enzims de restricció, fer-ne una electroforesi en gel d'agarosa i aïllar la banda corresponent mitjançant un "geneclean" (veure encabat).

- bullir 3 minuts la sonda per desnaturalitzar el DNA

- refredar una mica

- afegir la sonda a una bola ("Ready to go^R") (Pharmacia) composta de DNA polimerasa i els ingredients necessaris per a la síntesi de DNA

- afegir 5 µl de fòsfor radiactiu ³²P per a què s'integri al DNA sintetitzat

- deixar 10-20 minuts a 37°C; durant aquest temps es produirà la síntesi del DNA complementari al VEGF, marcat radiactivament. El DNA resultant serà bicatenari, pel que caldrà bullir altre cop encabat.

- centrifugar en una columna de la casa Pharmacia 2-4 minuts a 3000 rpm, amb l'objectiu que travessin el filtre que conté la columna només els fragments de DNA sintetitzats, i no els nucleòtids solts o petits oligonucleòtids ni la DNA polimerasa.

- fer un comptatge de la radiactivitat del resultat amb un comptador beta, en "counts" per milió (CPM). Habitualment s'emprarà uns 2 milions de CPM per ml de tampó d'hibridació.

- una vegada marcada la sonda, barrejar aquesta amb el tampó d'hibridació i afegir ssDNA (proporció: 10 µl de ssDNA per a cada ml de tampó) havent bullit prèviament tant el ssDNA com la sonda per desnaturalitzar-los.

- incubar la membrana amb el tampó barrejat amb la sonda i el ssDNA tota la nit (hibridar) dintre el forn d'hibridació a 42°C.

- l'endemà, amb la membrana de nylon:

ANNEXES MATERIAL I MÈTODES

- rentem 2x SSC + 0.1% SDS 30 minuts a TA
- rentem 2x SSC + 0.1% SDS 30 minuts a 55°C
- rentem 2x SSC + 0.1% SDS 15 minuts a 55°C
- rentem 2x SSC + 0.1% SDS 15 minuts a 55°C

- embolicar ja la membrana de nylon, i exposar amb una pel.lícula; variar la temperatura d'exposició, el temps i el tipus de pel.lícula segons la situació (mentre menys radiactivitat, major temps, menor temperatura i més sensible la pel.lícula).

Annex XIII: Aïllament de DNA d'una banda de gel d'agarosa ("geneclean").

El "geneclean" és un mètode que ens serveix per obtenir i purificar un nucleòtid que ens interessi a partir d'un gel. Així, per exemple, serà útil per obtenir la sonda del VEGF després d'haver fet una digestió amb Hind III i Xba I del plàsmid + l'insert i haver-lo migrat mitjançant electroforesi.

- localitzar en el gel la banda que ens interessa, mitjançant bromur d'etidi i visualització amb raigs ultraviolats. Aquest DNA està intacte. Interessa exposar el mínim possible la banda del DNA als raigs ultraviolats per a què no es lesioni.
 - retallar la banda del gel que interessa amb una ganiveta gillette.
 - pesar la banda. La col·loquem en un tub de plàstic (no de vidre, doncs el DNA s'hi adhereix). Posar 3 µl de NaI per µg de mostra, i incubar a 55°C fins que es desfaci l'agarosa (triga uns 5-10 minuts).
 - afegir glassmilk prèviament vortejada durant 1 minut per posar en suspensió la matriu de sílica a raó de 1 µl per a cada µg de DNA. La matriu de sílica de la glassmilk actuarà de lligadora del DNA.
 - incubar 30 minuts en gel, remenant cada 1-2 minuts per assegurar que la glassmilk es mantingui en suspensió. Normalment amb 5 minuts n'hi hauria prou, però augmentant l'estona es propicia una major recuperació del DNA.
 - centrifugar al màxim 15 segons
 - eliminar el sobrenedant, que és el que conté NaI.
 - resuspendre el pellet amb 200 µl de "wash solution"
 - centrifugar al màxim; rebutjar el sobrenedant.
 - resuspendre en 200 µl de wash solution.
 - centrifugar (poc, suficient per a què la glassmilk se'n vagi al fons). Rebutjar el sobrenedant.
 - resuspendre en 200 µl de wash solution
 - centrifugar. Rebutjar el sobrenedant.
 - eluir amb H₂O amb un volum igual al que s'havia emprat de glassmilk, i incubar 10 minuts a 55°C.
 - centrifugar; guardar el sobrenedant, que conté el DNA.
 - tornar a eluir amb el mateix volum d'H₂O, i incubar altre cop 10 minuts a 55°C.
- Amb la primera elució s'acostuma a obtenir un 80% del DNA, amb la segona, se sol recuperar quasi el 20% restant.
- centrifugar
 - ajuntar els 10 µl de les dues elucions amb H₂O. Rebutjar el pellet.
 - centrifugar els 10 µl novament per eliminar la sílica (glassmilk) remanent.
 - guardar ja a -20°C per a emprar posteriorment com a sonda. Abans es pot comprovar que estigui bé corrent 1 µl en un gel d'agarosa i tenyint-lo posteriorment amb bromur d'etidi.

Annex XIV: Extracció de mRNA.

Hem seguit el Protocol comercial “kit d’aïllament de mRNA MiniRiboSept™” de Becton-Dickinson.

- Es parteix d'un precipitat de cèl.lules de melanoma transfectades i cultivades.
- a cada precipitat afegir 10 ml de tampó o "buffer" de lisi (escalfat a 37°C per assegurar que el SDS quedi dissolt) i 50 µl de proteinasa k (aquesta darrera just abans d'emprar-la). Homogeneitzar el material mitjançant xeringa i agulla.
- incubar 2 hores a 45°C amb agitació intermitent. Mentrestant, preparar ja les resines, 1 càpsula de resina per a cada 10⁶-10⁸ cèl.lules.

Les resines són "oligodT": són nucleòtids sintètics que ajunten una seqüència seguida de T; motiu: el mRNA, per sortir del nucli, ha de tenir seqüències poliA, complementàries per tant als oligodT; així, amb els oligodT es pesca només el mRNA.

- Preparació de les resines:

- 1 càpsula de resina per a cada 10⁶-10⁸ cèl.lules. Es buida en un tub estèril, i es rehidrata amb 2 ml de buffer d'elució. Centrifugar 5 minuts a 3000 g.
- rentar dues vegades amb 2 ml de buffer d'elució per a cada rentada, fent cada vegada 5 minuts de centrífuga a 3000 g.
- equilibrar la resina rentant 2 vegades amb 1 ml de binding buffer centrifugant entre rentats 5 minuts a 3000 g.
- fer finalment un pellet amb centrífuga i guardar a TA amb 1 ml de binding buffer fins a afegir el lisat.
- afegir 600 µl (60 µl per ml de lisat) de NaCl 5 M a cada tub del lisat, per tal d'equilibrar la concentració de NaCl, que és 0.2 M al lisat, i 0.5 M al binding buffer.
- barrejar la lisi amb les resines, i deixar mesclant 1 hora i 40 minuts agitant de forma intermitent.
- centrifugar 3000 g 5 minuts. Rebutjar el sobrenedant.
- afegir 5 ml de "binding buffer" o tampó de lligament
- centrifugar 3000 g 5 minuts. Rebutjar el sobrenedant
- afegir 5 ml de “binding buffer”.
- centrifugar 3000 g 5 minuts.
- resuspendre amb 250 µl de “binding buffer”.
- amb la pipeta passar-ho a un tub net per centrifugar 10 segons a 5000 g i no llençar el tub previ, doncs li resta resina remanent. Eliminar el sobrenedant.
- al tub previ amb la resina remanent, afegir 300 µl de “binding buffer”, i transferir tot al tub net on s’ha centrifugat la darrera vegada.
- centrifugar tot 10 segons a 5000 g. Rebutjar el sobrenedant.
- tornar a posar 250 µl de “binding buffer” i resuspendre.
- re-centrifugar igual. Eliminar el sobrenedant.
- re-centrifugar novament. Tornar a eliminar el sobrenedant.

- afegir 200 µl d'elution buffer
- centrifugar 10 segons a 5000 g.
- sense treure els 200 µl, afegir 200 µl més d'elution buffer, resuspenent amb la pipeta.
- centrifugar 10 segons a 5000 g.
- precipitar el mRNA afegint 0.1 volums de NaOAc 3 M (40 µl) seguit per 2 volums d'etanol absolut (800 µl).
- es pot ja congelar a -70°C
- o bé es pot emprar centrifugant 15 minuts a 5000 g aproximadament a 4°C. Eliminar el sobrenedant (etanol); és important que quedi ben eixut d'etanol; si no, no es resuspendrà bé encabat; per a això, deixar eixugar sota la campana de flux laminar 90 minuts.
- resuspendre amb 25 µl d'aigua estèril per a injectables.
- una vegada resuspès, diluir 3 µl de la mostra a 1:200 (3 µl de mostra, 597 µl H₂O), i la resta de mostra es guarda a la nevera per a posterior treball.
- Amb la dilució 1:200 llegir la concentració a l'espectrofotòmetre tal com es descriu a l'extracció del DNA. Aquí, la fórmula per calcular la concentració és diferent al DNA:

$$[\text{mRNA}] = \text{absorbància } 260 \text{ nm} \cdot 0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l} \cdot D$$

on D és el factor de dilució (200)

- una vegada coneguda la concentració, córrer el mRNA en un gel petit per comprovar que no estigui degradat.

Annex XV: Northern blot.

- preparar un gel d'agarosa al 1%: 2.75 gr d'agarosa + 50 ml formaldehid al 30% + 25 ml MOPS 10x + 175 ml H₂O.
- Enfonsar el gel amb MOPS 1x (diluir amb H₂O destilada estèril; motiu: cal medi lliure de RNAses).
- carregar els pouets del gel: en un eppendorf, µl de RNA per fer 10 µg (per exemple 15 µl) + 37.5 µl formamida 100% + 15 µl formaldehid 37% + 7.5 µl MOPS 10x. Posar 10 minuts a 65°C i afegir llavors 7.5 µl de "blue juice".
- mitjançant electroforesi córrer el RNA overnight a 30 V. Aturar l'electroforesi quan el blau estigui al final del gel, sense que es vessi.
- tenyir el gel amb bromur d'etidi, i fotografiar per localitzar les bandes.
- rentar el gel, canviant l'aigua (destil.lada o mili Q) cada 20 minuts, durant 2 hores.
- 3 rentats amb SSC 20x de 20 minuts cadascun.
- blotar tal com es descriu al Southern blot, i deixar el blot 24 hores.
- post-blot, fixar les membranes 1 minut i mig amb raigs ultraviolats, després de rentar una mica la membrana amb SSC 2x i eixugar a TA.
- posar la membrana amb tampó de pre-hibridació tal com es descriu també al Southern blot:
 - tampó de pre-hibridació:
 - 7.5 ml formamida 100%
 - 3.75 ml SSC 20x
 - 1.5 ml Denhardt's
 - 2.25 ml H₂O
 - Total, 15 ml, filtrar amb un paper de filtre normal, resultant 13 ml
 - Afegir llavors 130 µl de DNA d'esperma de salmó bullit prèviament 5-10 minuts.
- incubar la membrana amb tampó de pre-hibridació durant 2 hores com a mínim a 42°C, al forn d'hibridació.
- hibridació:
 - tampó d'hibridació:
 - 7.5 ml formamida 100%

- 3.75 ml SSC 20x
- 3 ml dextrà sulfat
- 300 µl Denhardt's
- 0.45 ml H₂O

Total, 15 ml, filtrar amb un paper de filtre normal.

- marcar radiactivament amb ³²P la sonda de VEGF tal com es descriu al Southern blot
- una vegada marcada la sonda, barrejar aquesta amb el tampó d'hibridació i afegir ssDNA bullit (proporció: 10 µl de ssDNA per a cada ml de tampó).
- incubar la membrana amb el tampó barrejat amb la sonda i el ssDNA tota la nit (hibridar) dintre el forn d'hibridació a 42°C.
- l'endemà:
 - rentar 2x SSC + 0.1% SDS 30 minuts a TA
 - rentar 2x SSC + 0.1% SDS 30 minuts a 55°C
 - rentar 2x SSC + 0.1% SDS 15 minuts a 55°C
 - rentar 2x SSC + 0.1% SDS 15 minuts a 55°C
- embolicar ja la membrana de nylon, i exposar amb una pel·lícula; variar la temperatura d'exposició, el temps i el tipus de pel·lícula segons la situació (mentre menys radiactivitat, major temps, menor temperatura i més sensible la pel·lícula).
- Al revelar, comparar l'expressió de mRNA entre els diferents clons, i triar aquells que més mRNA produeixin per treballar-hi. Per escollir el control, triar qualsevol clon que produeixi el VEGF endògen.
- Hibridació de la membrana amb GADPH.
 - encabat del Northern blot sobre la membrana amb la sonda per al VEGF, procedir a deshibridar per eliminar aquesta sonda:
 - 68°C overnight amb tampó de deshibridació
 - l'endemà, s'extrau, i posar en:
 - 0.1% SDS 15 minuts
 - 0.2 M TRIS 15 minuts
 - embolicar, i deixar overnight a -80°C
 - revelar l'endemà; si surt neta, la deshibridació ha estat correcta.
 - incubar amb el tampó de deshibridació tal com es descriu, 2 hores a 42°C al forn d'hibridació
 - hibridar amb el tampó d'hibridació barrejat amb la sonda marcada radiactivament, essent en aquest cas la sonda per a la GADPH.

ANNEXES MATERIAL I MÈTODES

- Revelar finalment igual que al Northern blot del VEGF.

Annex XVI: Extracció de proteïnes del medi condicionat.

- Recollir 10 ml de medi condicionat de dues plaques de cultiu de cèl.lules de melanoma de cada clon dels triats. Aquest medi condicionat és sense sèrum i té 48 hores. Motiu: sense sèrum boví, perquè si no les proteïnes bovines normals dificultarien la tècnica a l'hora de fer el Western. Es fa de 48 hores per a què hi hagi moltes proteïnes produïdes per les cèl.lules de melanoma.

- centrifugar el medi condicionat per descartar les possibles cèl.lules presents, a 2500 rpm, 4°C, 10 minuts.

Annex XVII: Western blot.

- Preparar un gel d'acrilamida:

- acrilamida al 12%: 3.35 ml H₂O + 2.5 ml TRIS HCl pH 8.8 + 4 ml acribis 30% + 0.1 ml SDS 10% + 200 µl AMPs + 18 µl TEMED

- acrilamida al 4% (gel apilador): 3.05 ml H₂O + 1.25 ml TRIS HCl pH 6.8 + 0.65 ml acrilamida 30% + 50 ml SDS 10% + 100 µl AMPs + 18 µl TEMED.

- A cada pouet ficar 100 µl de medi condicionat. Els ingredients a cada pou són: els µl de mostra per fer 50 µg de proteïna + 10 µl tampó 5x DTT + els µl d'H₂O per fer un volum total de 50 µl. (El DTT a la mostra es queda 0.01 M, i el tampó és inicialment 5x però a la mostra es quedarà 1x).

El tampó DTT serveix per fer el Western blot en condicions de reducció: prèviament bullir les mostres 10 minuts amb el DTT, i encabat conservar en gel. Durant el procés d'ebullició s'aconsegueix separar els complexos proteics que es puguin haver format. El DTT bloquejarà els ponts disulfur impeding que les proteïnes posteriorment es tornin a unir entre elles.

- Practicar electroforesi del gel, que estarà submergit en tampó cubeta 1x, amb un voltatge de 200 V fins que el blau sigui a baix (triga 45-60 minuts).

- blot: muntar el gel i la membrana de nitrocel.lulosa en un bloc especial de plàstic successivament de la següent manera: la placa de plàstic negra del bloc, un fregall especial, paper whatman, gel d'acrilamida, membrana de nitrocel.lulosa, paper whatman, novament un altre fregall i placa de plàstic blanc del bloc; la placa blanca correspon al pol positiu, i és on migraran les proteïnes.

Blotar overnight a 30-45 V, o bé a 100 V durant 1 hora.

- encabat del blot, es pot veure la posició de les bandes proteiques mitjançant un gel colorant.

- Posar la membrana de nitrocel.lulosa a bloquejar 2 hores a TA en agitació amb TBS 1x + llet 5%.

- Incubació amb Ac primari monoclonal antiVEGF dissolt 1:200 (amb TBS 1x + 5% llet + 0.2% tween 20) durant 2 hores a TA en agitació.

- 3 rentats amb TBS 1x + 0.2% tween 20 de 10 minuts cadascun.

- incubació amb l'Ac secundari anti-mouse peroxidasa (Amersham) diluït 1:500 (en TBS 1x + llet 5% + 0.2% tween

ANNEXES MATERIAL I MÈTODES

20) a TA durant 1 hora i mitja en agitació.

- rentar 1 hora en agitació amb TBS 1x + 0.2% tween 20

- Revelat: aplicar 2 ml d'ECL durant 3 minuts, i revelar en uns minuts amb una pel·lícula normal. L'ECL fa una reacció luminiscent amb la peroxidasa que porta l'Ac secundari.

Annex XVIII: Avaluació de la corba de creixement mitjançant la incorporació de timidina tritiada i càlcul de biomassa amb SRB (Sulforodamina B).

- Preparar 8 plaques de 96 pous: 4 per a la línia A375P, 4 per a la A375MM.
- Introduir 100 µl de medi de cultiu FSC al 10% a cada pou, i posar a l'estufa a 37°C.
- Tripsinitzar els clons a mesurar, i preparar 100 µl de medi de cultiu FSC al 10% amb les cèl.lules de cada clon de manera que la concentració final sigui a tots els pous de 3000 cèl.lules / 100 µl.

Les plaques es mesuraran en 4 temps, de 18, 42, 66 i 114 hores. A cada temps es mesurarà una placa per a cada línia (A375P i A375MM). Dintre cada placa, cada clon serà mesurat en 3 pous diferents per a la incorporació de timidina tritiada i en 3 pous més per al càlcul de biomassa amb SRB.

- preparar timidina tritiada 1 mCi/ml amb medi de cultiu sense sèrum
- al temps zero, afegir a la “placa 1” de cada línia la timidina tritiada als tres pous corresponents per a cada clon de manera que quedi en cada pou 0.25 µCi de timidina tritiada / 250 µl de medi de cultiu
- al temps de 18 h: retirar el medi amb timidina, i afegir 50 µl d'àcid tricloroacètic al 5%. Als tres pous corresponents a la recta de SRB, sense retirar res, afegir 50 µl d'àcid tricloroacètic al 50%. Incubar mitja hora a 4°C. Canviar el tricloroacètic al 5% de la corba de timidina per uns altres 50 µl del mateix. Guardar a 4°C.
- al temps 24 hores, afegir a la “placa 2” de cada línia la timidina tritiada com abans.
- al temps 42 hores, aturar les corbes amb timidina tritiada i amb SRB com s'ha descrit abans.
- al temps 48 hores, afegir a la “placa 3” la timidina tritiada.
- al temps 66 hores, aturar ambdues corbes de creixement.
- al temps 96 hores, afegir a la “placa 4” la timidina tritiada.
- al temps 114 hores, aturar igualment.
- Mesura de la corba de timidina:
 - rentar 2 vegades cada pou amb àcid tricloroacètic al 5% fred
 - posar a cada pou 100 µl d'etanol/éter en proporció 2/1
 - incubar 30 minuts a 4°C

ANNEXES MATERIAL I MÈTODES

- retirar l'etanol/éter i deixar eixugant tota la nit
- resuspendre l'endemà amb 100 µl NaOH 1 N
- incubar 30 minuts a 37°C
- remenar i extreure 50 µl de cada pou, posar en tub de centelleig amb 5 ml de medi de centelleig i llegir

- Mesura de la corba amb SRB:
 - treure l'àcid tricloroacètic al 50%
 - rentar diverses vegades amb aigua de l'aixeta
 - deixar eixugant tota la nit
 - l'endemà, posar 35 µl de SRB (0.4% SRB dissolt en àcid acètic a l'1%) i incubar 30 minuts a temperatura ambient
 - rentar 4 vegades amb àcid acètic a l'1%
 - deixar eixugant a temperatura ambient dues hores
 - resuspendre amb 200 µl de TRIS 10 mM pH 10.5
 - llegir l'absorbància a l'espectrofotòmetre amb el filtre de 510 nm