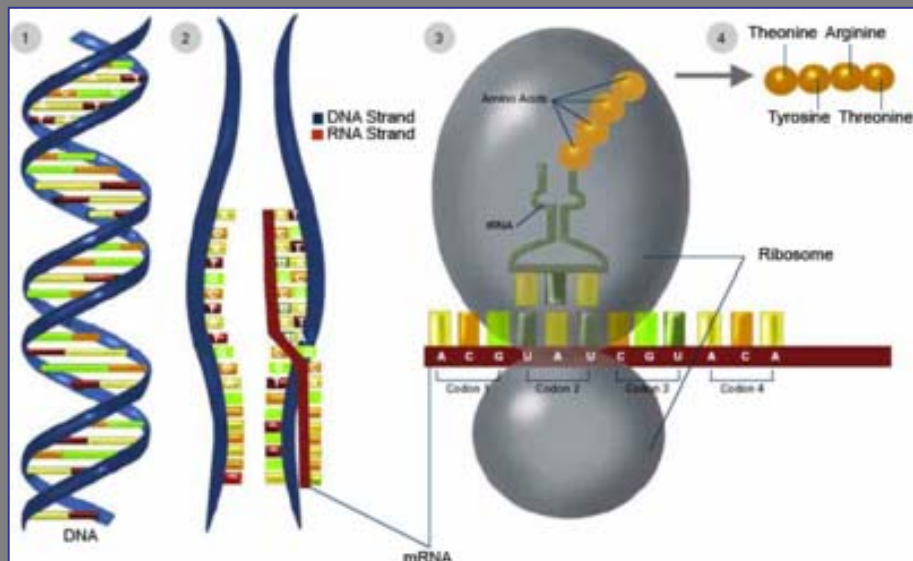




UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I
BIOLOGIA MOLECULAR**



**MANUAL DE PRÀCTIQUES DE BIOLOGIA
MOLECULAR**

TERCER CURS

GRAU DE BIOTECNOLOGIA

ÍNDEX

Calendari orientatiu.....	2
Pràctica 1. Regulació de la síntesi de l'enzim β -galactosidasa en <i>Escherichia coli</i>	3
Pràctica 2. Organització de la cromatina. El seu paper en l'expressió gènica.....	6
Pràctica 3. Comprovació de la presència d'un intró en el gen <i>ACT1</i> del llevat <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
Pràctica 4. Regulació de l'expressió dels gens <i>GAL</i> en el llevat <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Objectius de les pràctiques i activitats que cal desenvolupar.....	14
Bibliografia	15

CALENDARI ORIENTATIU

PRIMER DIA

- Regulació de la síntesi de l'enzim β -galactosidasa en *Escherichia coli* (pràctica 1, completa)
- Inoculació de les soques de llevat (pràctica 4, apartat 4.1)

SEGON DIA

- Digestió amb MNasa dels nuclis d'eritròcit i preparació de les mostres per a l'electroforesi en agarosa (pràctica 2, apartat 2.2)
- Preparació del gel d'electroforesi (pràctica 2, apartat 2.3)
- Control dels cultius de llevat (pràctica 4, apartat 4.2)

TERCER DIA

- Injecció de les mostres de cromatina en el gel d'agarosa i electroforesi (pràctica 2, apartat 2.3)
- Amplificació mitjançant PCR de la regió del gen *ACT1* que inclou l'intró (pràctica 3, apartat 3.1)
- Preparació del gel d'electroforesi (pràctica 3, apartat 3.2)
- Presa de mostres de cultius de llevat en medis amb diferent font de carboni (pràctica 4, apartat 4.3)

QUART DIA

- Anàlisi electroforètica dels productes de PCR (pràctica 3, apartat 3.2)
- Mesura d'activitat β -galactosidasa en les cèl·lules de llevat (pràctica 4, apartat 4.4)
- Elaboració dels resultats de les pràctiques

CINQUÈ DIA

- Anàlisi global dels resultats
- Qüestionari

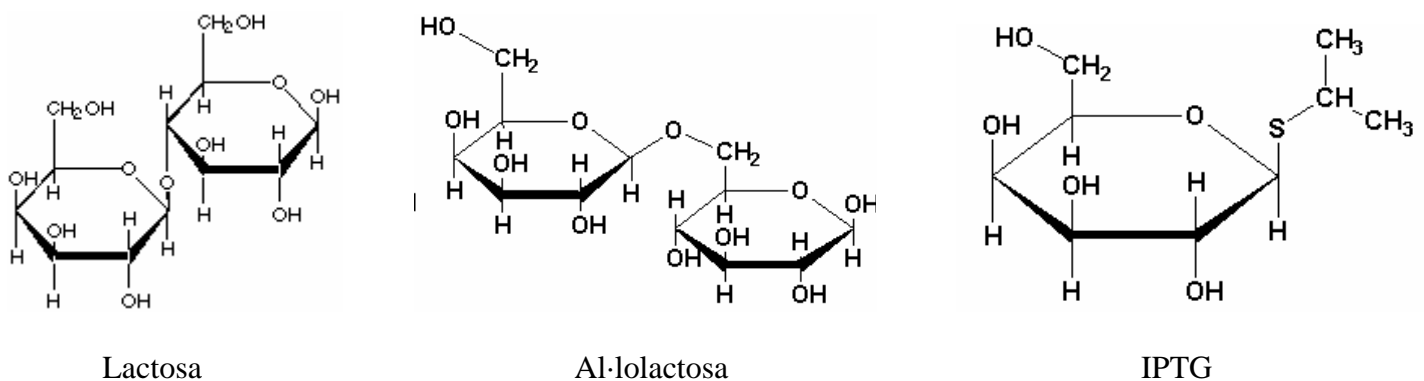
PRÀCTICA 1. REGULACIÓ DE LA SÍNTESI DE L'ENZIM β -GALACTOSIDASA EN *Escherichia coli*

L'enzim β -galactosidasa hidrolitza una àmplia varietat de glicòsids, entre els quals es troba la lactosa. La quantitat d'aquest enzim en la cèl·lula està controlada inicialment en el nivell de transcripció.

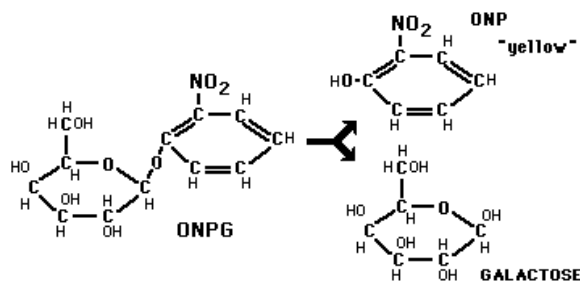
La glucosa i el glicerol són les fonts de carboni preferides per *E. coli*, encara que aquest bacteri també pot fer servir uns altres sucres, com el disacàrid lactosa, com a única font de carboni. Quan *E. coli* creix usant glucosa no necessita activitat β -galactosidasa, de manera que aquest enzim és present en només 60 còpies per cèl·lula. Per a utilitzar la lactosa, la cèl·lula requereix l'enzim esmentat, amb la finalitat d'hidrolitzar el disacàrid en els monosacàrids glucosa i galactosa. Quan els bacteris creixen fent servir només lactosa com a font de carboni, la quantitat d'enzim pot ser superior a 60.000 molècules per cèl·lula, la qual cosa significa una inducció de 1.000 vegades. Per tant, la β -galactosidasa constitueix un exemple d'enzim induïble. Juntament amb la **β -galactosidasa** (MM 116300) se sintetitzen uns altres dos enzims, la **permeasa de galactosa** (MM 46500, que transporta la lactosa a través de la cèl·lula) i la **tiogalactòsid transacetilasa** (MM 22700, implicada potser en la destoxicació de determinats tipus de galactòsids i que actua en forma de dímer). Cadascun d'aquests enzims té el seu propi gen estructural: *lacZ*, *lacY* i *lacA*, respectivament.

Els tres gens estan regulats de manera conjunta ja que formen part d'un operó, amb un promotor, un operador (seqüència reguladora) i un gen regulador comuns. L'**RNA polimerasa** s'uneix al **promotor** i inicia la transcripció de la cadena de DNA que conté les seqüències adequades. La unió de l'RNA polimerasa està incrementada per l'associació de la proteïna receptora d'AMP cíclic (**CAP**), que també s'uneix a aquesta regió de l'operó *lac*. CAP és activa en presència de cAMP i estimula la síntesi del corresponent mRNA en aproximadament 50 vegades. La **glucosa** controla els nivells de cAMP en la cèl·lula, i evita així aquesta inducció quan les cèl·lules disposen d'aquesta font de carboni. Per a evitar que l'RNA polimerasa estiga transcrivint contínuament els gens *lac*, hi ha una seqüència de DNA anomenada **operador** en què s'uneix una proteïna repressora (el **repressor**, codificat per l'anomenat **gen regulador**). Quan el repressor *lac* (tetràmer de monòmers amb MW 38600) s'uneix a aquest lloc, impedeix que l'RNA polimerasa transcriu els gens. Així, en absència de lactosa, el repressor *lac* està unit a l'operador i la transcripció està impedita, de manera que el nombre de còpies de β -galactosidasa és baix. Tanmateix, quan la lactosa és present, el repressor *lac* s'uneix a la lactosa o a galactòsids anàlegs (al·lolactosa) però no a l'operador, i l'RNA polimerasa pot transcriure els gens *lac*. Podem dir que la **lactosa** seria un inductor, ja que indueix la síntesi de l'enzim. Un altre compost que pot induir la síntesi de β -galactosidasa és l'isopropil-tio- β -galactòsid (**IPTG**), anàleg de l'al·lolactosa. Com que aquesta molècula és capaç d'induir la síntesi de l'enzim però roman en la cèl·lula (no pot ser hidrolitzat per cap enzim) sol anomenar-se **inductor gratuït**.

En aquesta pràctica pretenem estudiar la regulació de la transcripció del gen *lacZ* en *E. coli* mitjançant l'anàlisi de l'efecte de l'addició de glucosa, lactosa i/o IPTG a cèl·lules en fase de creixement logarímic sobre els nivells de la proteïna codificada. Per tal de cobrir aquest objectiu, s'han de determinar els canvis en l'activitat β -galactosidasa abans i després d'afegir aquests compostos. L'activitat d'aquest enzim s'ha de mesurar fent servir com a substrat o-nitrofenil- β -D-galactòsid (ONPG) per a alliberar o-nitrofenol. Aquest producte, en presència de bases fortes en la solució, desenvolupa un color groc lluent que presenta el seu màxim d'absorció de llum a una λ de 420 nm.



Figures procedents de: <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/macromoleculas/azucar.htm>,
<http://www.pearsonhighered.com/mathews/ch26/allolact.htm> i <http://www.pearsonhighered.com/mathews/ch26/iptg.htm>



Assaig β -galactosidasa. Figura procedent de <http://www.science-projects.com/VAS/Talk03.htm>

PROTOCOL EXPERIMENTAL

1.1. CREIXEMENT DE LES CÈL·LULES

- 1) S'inocula la soca d'*Escherichia coli* HB101 en 10 mL del medi TA i es creix a 37°C durant la nit. Al dia següent, se sembren uns 2 mL del precultiu en 200 mL de medi TA temperat i s'incuba a 37°C fins que arribe a una DO_{600} d'aproximadament 0,3 (enfrent d'aigua). Es guarda com a cultiu estoc en gel. (Aquesta part la fa el professor).
- 2) Se separen alíquotes de 8 mL del cultiu estoc (2 per cada parella) en tubs Corning i s'incuben a 37°C en presència de diferents fonts de carboni o de l'inductor artificial, per a la qual cosa s'ha d'afegir en diferents tubs:
 - A. 300 μ L de lactosa 20% (p/v)
 - B. 100 μ L d'IPTG 15 mM
 - C. 500 μ L de glucosa 10% (p/v) i, a continuació, 300 μ L de lactosa 20% (p/v)
 - D. 300 μ L de H₂O (**CONTROL**)

El moment de l'addició de cadascuna d'aquestes substàncies es considera temps 0. Immediatament, i una vegada agitat el tub, es pren una alíquota d'aproximadament 1,5 mL (un Eppendorf ple). Els tubs Corning s'incuben en un bany a 37°C i s'agafen alíquotes d'1,5 mL dels cultius a temps 10, 30 i 45 minuts respecte del temps zero.

- 3) Amb els 1,5 mL de les alíquotes separades es mesura immediatament la DO_{600} (un mL aproximadament) i la resta es guarda en gel per a determinar-ne l'activitat β -galactosidasa.

1.2. LISI DE LES CÈL·LULES

Per a fer l'assaig de l'activitat β -galactosidasa, en primer lloc, cal trencar les cèl·lules per a alliberar l'enzim. Una manera ràpida de lisar els bacteris és afegir-hi una dissolució de toluè/desoxicolat. Mitjançant aquest tractament les membranes se solubilitzen i s'allibera el contingut cel·lular. A més, s'inhibeix qualsevol síntesi enzimàtica que poguera tenir lloc, la qual cosa permet mantenir les mostres a temperatura ambient fins que estiguen totes preparades per a mesurar l'activitat β -galactosidasa.

- 4) De cada alíquota de les separades durant el creixement es transfereixen 100 μ L a un tub d'hemòlisi i **immediatament** s'hi afegixen 2 μ L de toluè i 2 μ L de desoxicolat 1% (p/v). La mescla cel·lular s'agita durant 4 minuts.

1.3. ASSAIG β -GALACTOSIDASA

- 5) S'afegeix a les cèl·lules toluenitzades (quan ja s'han pres tots els temps) 700 μ L d'ONPG (0,75 mg/mL en fosfat sòdic 50 mM pH 7,0).
- 6) S'incuba la mescla durant 15 minuts a temperatura ambient (preferiblement en aigua per a reduir les fluctuacions tèrmiques).

- 7) S'atura la reacció afegint 200 µL de Na₂CO₃ 1 M, es transfereix tot el volum a un Eppendorf i se centrifuga a 10.000 rpm 5 min per a eliminar els residus de cèl·lules.
- 8) Es mesura la DO₄₂₀ fent servir aigua com a blanc. Es pot mesurar també la DO₆₀₀, encara que, una vegada duta a terme la centrifugació anterior, ha de ser molt baixa.
- 9) Es calcula l'activitat enzimàtica amb l'equació següent:

$$(DO_{420}-DO_{600}) \times 1000 / v \text{ (mL del cultiu)} \times t \text{ (min)} \times DO_{600} \text{ del cultiu}$$

Es duu a terme una representació gràfica dels resultats en forma d'histograma. (Seria convenient, encara que no necessari, fer amb cada mostra un control negatiu afegint carbonat sòdic a les cèl·lules lisades, abans de l'ONPG. El valor de DO₄₂₀ obtingut així s'hauria de restar al del tub problema corresponent).

- 10) Es pot calcular, opcionalment, l'activitat β-galactosidasa per cèl·lula en cada mostra. Per tal de fer això s'ha de tenir en compte que ε₄₂₀ per a l'o-nitrofenol és 18400 M⁻¹cm⁻¹, que una unitat d'activitat β-galactosidasa correspon a 1 mmol d'o-nitrofenol format per minut a pH i a temperatura ambient, i que una DO₆₀₀ d'1,0 correspon a una concentració de 2 x 10⁷ cèl·lules/mL.
- 11) També es pot calcular el nombre de molècules de β-galactosidasa per cèl·lula per al cultiu tractat amb IPTG a 0 i 45 minuts. Per a això les dades que es necessiten són: activitat específica de β-galactosidasa: 500 unitats/mg de proteïna, MM 116300 i nombre d'Avogadro: 6,023 x 10²³ molècules/mol.

MATERIAL, PRODUCTES I DISSOLUCIONS

Material biològic

Soca d'*Escherichia coli* HB101

Material

2 tubs Corning estèrils de 15 mL per parella
 Agitador de matrassos en cambra de 37°C
 Colorímetre i cubetes de colorímetre
 Bany d'aigua
 Agitador de tubs (Vortex)
 Eppendorfs d'1,5 mL
 Pipetes automàtiques de 20, 200 i 1000 µL i puntes de pipeta estèrils
 Tubs d'hemòlisi

Productes i dissolucions

Medi TA: Triptona 1,2% (p/v), Extracte de llevat 4% (p/v), Glicerol 0,4% (v/v), KH₂PO₄ 0,017 M, K₂HPO₄ 0,072 M, Tris-HCl 20 mM pH7,5

(Es necessiten 210 mL per grup de pràctiques)

Aigua destil·lada estèril

Lactosa 20% (es necessiten 7 mL)

IPTG 15 mM (es necessiten 1,5 mL)

Glucosa 10% (es necessiten 7 mL)

Toluè (es necessiten 3 mL)

Desoxicolat sòdic 1% (p/v) (es necessiten 3 mL)

ONPG 0,75 mg/mL en fosfat sòdic 50 mM pH 7,0 (es necessiten uns 15 mL de tampó)

Na₂CO₃ 1 M (es necessiten 15 mL)

PRÀCTICA 2: ORGANITZACIÓ DE LA CROMATINA. EL SEU PAPER EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA

Una de les característiques que diferencia l'organització gènica d'eucariotes de la de procariotes és l'associació del DNA amb una massa aproximadament igual de proteïnes per a formar la cromatina. La seua unitat bàsica repetitiva és el nucleosoma. El grau de compactació de la cromatina afecta l'accessibilitat de la maquinària implicada en la transcripció dels gens; de fet, els gens actius, els que es transcriuen, tenen una estructura de la cromatina alterada si la comparem amb la dels gens inactius. La posició i la rigidesa dels nucleosomes és fonamental per a regular l'accés de les proteïnes participants en la transcripció i es pot controlar a través de complexos remodeladors de la cromatina i complexos histona acetiltransferasa i desacetilasa.

Una de les nucleases utilitzades més sovint en estudis de cromatina és la nucleasa de micrococ (MNasa), que talla en els separadors de nucleosomes. Això permet analitzar allò que es coneix com a *posicionament* de nucleosomes, és a dir, la localització precisa d'aquests en relació amb la seqüència en un DNA no repetitiu. La utilització d'aquesta nucleasa ha permès determinar canvis en l'organització dels nucleosomes que tenen lloc en la cromatina activa.

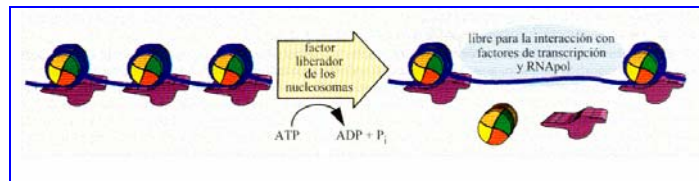


Figura procedent de Luque, J. i Herráez, A. (2001)

PROTOCOL EXPERIMENTAL

2.1. AÏLLAMENT DE NUCLIS D'ERITRÒCIT DE POLLASTRE

Aquest protocol no es realitza en pràctiques, es dóna només a títol informatiu.

- 1) Es mesclen 100 mL de sang de pollastre acabat de sacrificar amb un volum igual de tampó SSC fred (4°C).
- 2) Les cèl·lules (eritròcits fonamentalment) se separen del plasma per centrifugació a 500g, 10 min i es renten dues vegades amb SSC fred.
- 3) Les cèl·lules rentades es resuspenen en aproximadament 4 volums (respecte del volum de les cèl·lules) de tampó de lisi i es mantenen en agitació 90 min a 4°C.
- 4) Els nuclis alliberats així s'arreguen per centrifugació a 1.000 rpm, 10 min i es renten amb el mateix tampó de lisi diverses vegades, fins que s'obté un líquid sobrenadant clar.
- 5) Aleshores es resuspenen al mateix tampó de lisi suplementat amb glicerol al 66%, i es guarden a -20°C.
- 6) Com a comprovació del procés de purificació, els nuclis purificats i les cèl·lules senceres poden ser observats al microscopi.

2.2. DIGESTIÓ DELS NUCLIS AMB NUCLEASA DE MICROCOC (MNasa) I PREPARACIÓ DE LES MOSTRES PER A L'ELECTROFORESI

- 1) Cada grup pren una alíquota de 50 µL de la suspensió de nuclis (agitada prèviament de manera suau) i la dilueix amb 1 mL de tampó RSB en un vial d'1,5 mL. Es mescla suaument.
- 2) Els nuclis es recullen per centrifugació (2.000 rpm, 2 min).
- 3) S'elimina el sobrenadant amb una pipeta i el sediment (els nuclis) es resuspèn, amb l'ajuda de la pipeta automàtica, en 1,2 mL de RSB.
- 4) Digestió amb MNasa. Paral·lelament als tres apartats anteriors, es prepara, abans de començar la digestió:
 - **Dilució de l'enzim:** un dels grups dilueix un vial de MNasa (15 u/µL) de 5 µL amb 155 µL de RSB per a obtenir una concentració final de 0,4 u/µL. Aquesta MNasa la utilitzaran tots els grups.
 - **Aturada de la reacció:** cada grup prepara dos Eppendorfs d'1,5 mL amb 30 µL d'EDTA 100 mM i els deixa en gel (marcats com 4 i 20).

- **Temps 0:** dos dels grups preparen un tercer Eppendorf (marcat amb 0) amb 30 μL d'EDTA, al qual afegiran directament 300 μL del vial de la mostra dels nuclis resuspensa en 1,2 mL de RSB. **El tub es conserva en gel.**

Els vials amb els nuclis s'han de temperar a 37°C durant uns 5 min. A continuació s'ha d'afegir la quantitat apropiada de MNasa a cada vial:

- A: 2 μL de MNasa (0,8 unitats)
 - B: 6 μL de MNasa (2,4 unitats)
 - C: 10 μL de MNasa (4,0 unitats)
 - D: 14 μL de MNasa (5,6 unitats)
- 5) Als temps 4 i 20 min es trauen alíquotes de 300 μL i es passen a l'Eppendorf corresponent, que conté EDTA. La mescla s'agita i es guarda sobre gel (després de traure l'alíquota de 4 min, el tub dels nuclis amb la MNasa s'haurà de mantenir al bany a 37°C per tal que la reacció pugui continuar).
 - 6) Quan totes les mostres es troben en gel i continguin EDTA, s'hi afegeix 33 μL de SDS al 10% i 1,5 μL de proteïnasa K en cadascun dels vials (incloent-hi el 0). Els tubs s'agiten i incuben a 37°C durant 30 min.
 - 7) Una vegada transcorregut aquest temps, s'afegeix en cada tub 1 volum de fenol/cloroform (1/1, v/v) i s'agiten al Vortex (PRECAUCIÓ: el fenol és un producte tòxic i molt corrosiu). (Un volum vol dir aproximadament la mateixa quantitat en volum que hi ha al vial).
 - 8) Les fases se separen centrifugant a 10.000 rpm, 5 min.
 - 9) Amb una pipeta automàtica, s'extrauen 225 μL , aproximadament, de la fase aquosa (la fase superior) i es transfereixen a un vial nou (marcat).
 - 10) S'hi afegeix un volum de cloroform/alcohol isoamílic i es mesclen les fases per agitació.
 - 11) Es repeteix el punt núm. 8 i es passa la fase aquosa (uns 200 μL) a un nou Eppendorf.
 - 12) S'hi afegeixen 20 μL de NaAcO 3M i dos volums d'etanol a -20°C. S'agiten els tubs i es mantenen 20-30 min a -20°C.
 - 13) El precipitat format es recull centrifugant a 12.000 rpm, 10 min.
 - 14) Es decanta l'alcohol, es renta el sediment amb, aproximadament, 200 μL d'etanol 70%, i se centrifuga a 12.000 rpm, 3 min.
 - 15) S'elimina l'alcohol mitjançant succió al buit, tot procurant assecar bé les mostres i no absorbir el precipitat.
 - 16) Els precipitats secs es dissolen en 15 μL de solvent de mostres 1X per a electroforesi de DNA.

2.3. PREPARACIÓ DEL GEL D'AGAROSA. APLICACIÓ DE LES MOSTRES. TINCIÓ, DESTENYIT I OBSERVACIÓ DEL GEL

Preparació del gel d'electroforesi:

- 1) *La placa suport es neteja acuradament i es tanca pels extrems amb cinta adhesiva.*
 - 2) *Es prepara 75 mL d'agarosa 1,8% en TBE 0,5X. Perquè es dissolga completament, cal fondre-la amb un agitador magnètic amb placa calefactors (o un microones).*
 - 3) *L'agarosa es deixa refredar fins a una temperatura aproximada de 50°C, s'hi afegeix 1 μL de BrEt (10 mg/mL) i es vessa a la placa suport.*
 - 4) *La pinta per a formar els pouets es col·loca en un extrem de la placa.*
 - 5) *Una vegada solidificat, es retiren la cinta adhesiva i la pinta, i s'introdueix el gel a la cubeta, tot afegint suficient tampó TBE 0,5X per a cobrir-lo.*
- 1) S'apliquen les mostres (10-15 μL) amb una pipeta automàtica de 20 μL . Un dels pouets centrals es fa servir per a posar 5 μL d'un patró de grandàries consistent en múltiples de 100 pb.
 - 2) L'electroforesi es desenvolupa a 100 V fins que el blau de bromofenol arribi a 1 cm aproximadament del final del gel.
 - 3) Es fotografia el gel amb un transil·luminador amb llum ultraviolada.

MATERIAL, PRODUCTES I DISSOLUCIONS

Material biològic

Nuclis d'eritròcit de pollastre

Material

Tubs Eppendorf de 0,5 i 1,5 mL

Pipetes automàtiques de 20, 200 i 1.000 μ L

Puntes de pipeta estèrils

Matràs de 250 mL

Provetes de 100 mL i 1 L

Imant

Cinta i etiquetes adhesives

Recipients per a gel

Pinta de 20 pouets

Suport d'electroforesi

Cubeta i font d'electroforesi

Centrífuga Biofuge

Bany de 37°C (termobloc)

Agitador magnètic amb placa calefactora o microones

Sistema de buit

Transil·luminador de llum ultraviolada

Agitador de tubs (Vortex)

Productes i dissolucions

Tampó RSB: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl₂ 1 mM, NaCl 10 mM i MgCl₂ 1 mM (es necessiten 70 mL per cada grup de pràctiques)

MNasa: 15 u/ μ L, congelada en vials amb 30 μ L (1 vial/grup)

EDTA 100 mM, pH 8,0 (7 mL/grup)

SDS 10% (p/v) (7 mL/grup)

Agarosa

Proteïnasa K: 25 mg/mL, congelada en vials amb 50 μ L (1 vial/grup)

Fenol saturat en Tris-HCl, pH 7 (7 mL/grup)

Cloroform/alcohol isoamílic 24:1 (v/v) (7 mL/grup)

Fenol/cloroform/alcohol isoamílic 25:24:1 (v/v/v) (7 mL/grup)

Na CH₃COO 3M, pH 5,2 (8 mL/grup)

Etanol absolut (15 mL/grup)

Etanol 70% (v/v) (7 mL/grup)

Solvent de mostres (6X): glicerol 30%, TBE 6X, blau de bromofenol 0,25% (p/v) i blau de xilencianol 0,25% (p/v)

Tampó TBE: Tris 89 mM, àcid bòric 89 mM i EDTA 1 mM, pH 8,3

Bromur d'etidi 10 mg/mL en H₂O

Patró de M.W. P100.

PRÀCTICA 3: COMPROVACIÓ DE LA PRESENCIA D'UN INTRÓ EN EL GEN *ACT1* DEL LLEVAT *Saccharomyces cerevisiae*

En el llevat *S. cerevisiae* molts pocs gens presenten introns i, en cas de contenir-ne, sol haver-ne un i de grandària relativament menuda. En eucariotes superiors, al contrari, la majoria dels gens contenen alguns introns, que arriben a representar més del 90% de l'extensió del gen en alguns casos.

Un dels gens que conté un intró en *S. cerevisiae* és l'*ACT1*, que codifica l'actina. En la seqüència que es mostra a continuació es pot observar subratllada i en negreta la regió del gen corresponent a aquest intró.

ATGGATTCTGGTATGTTCTAGCGCTTGCACCATCCCATTTAACTGTAAGAAGAATTGCACGGT
CCCAATTGCTCGAGAGATTTCTCTTTTACCTTTTTTTACTATTTTTCACTCTCCCATACCTCC
TATATTGACTGATCTGTAATAACCACGATATTATTGGAATAAATAGGGGCTTGAAATTTGGA
AAAAAAAAAAAACTGAAATTTTTTCGTGATAAGTGATAGTGATATTCTTCTTTTATTTGCTAC
TGTTACTAAGTCTCATGTAATAACATCGATTGCTTCATTCTTTTTGTTGCTATATTATATGTTT
AGAGGTTGCTGCTTTGGTTATTGATAACGGTTCTGGTATGTGTAAAGCCGGTTTTGCCGGTGACGA
CGCTCCTCGTGCTGTCTTCCCATCTATCGTCGGTAGACCAAGACACCAAGGTATCATGGTTCGGTAT
GGGTCAAAAAGACTCCTACGTTGGTGATGAAGCTCAATCCAAGAGAGGTATCTTGACTTTACGTT
ACCCAATTGAACACGGTATTGTCACCAACTGGGACGATATGGAAAAGATCTGGCATCATACTTC
TACAACGAATTGAGAGTTGCCCCAGAAGAACACCCTGTTCTTTTACTGAAGCTCCAATGAACCCT
AAATCAAACAGAGAAAAGATGACTCAAATTATGTTTGAAACTTTCAACGTTCCAGCCTTCTACGTT
TCCATCCAAGCCGTTTTGTCCTTGTACTCTCCGGTAGAACTACTGGTATTGTTTTGGATTCCGGTG
ATGGTGTTACTCACGTCGTTCCAATTTACGCTGGTTTCTCTCTACCTCACGCCATTTTGAGAATCGA
TTTGGCCGGTAGAGATTTGACTGACTACTTGATGAAGATCTTGAGTGAACGTGGTTACTCTTTCTC
CACCCTGCTGAAAGAGAAATTGTCCGTGACATCAAGGAAAACTATGTTACGTCGCCTTGGACT
TCGAACAAGAAATGCAAACCGCTGCTCAATCTTCTTCAATTGAAAAATCCTACGAACTTCCAGAT
GGTCAAGTCATCACTATTGGTAACGAAAGATTCAGAGCCCCAGAAGCTTTGTTCCATCCTTCTGTT
TTGGGTTTGGAATCTGCCGGTATTGACCAAACCTTACAACCTCCATCATGAAGTGTGATGTGCGAT
GTCCGTAAGGAATTATACGGTAACATCGTTATGTCCGGTGGTACCACCATGTTCCCAGGTATTGCC
GAAAGAATGCAAAGGAAATCACCGCTTTGGCTCCATCTTCCATGAAGGTCAAGATCATTGCTCC
TCCAGAAAGAAAGTACTCCGTCTGGATTGGTGGTTCTATCTTGGCTTCTTTGACTACCTTCCAACA
AATGTGGATCTCAAAACAAGAATACGACGAAAGTGGTCCATCTATCGTTCACCACAAGTGTCTTCT
AA

Una manera senzilla de detectar la presència d'un intró és mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), amb la selecció d'encebadors situats als dos costats de l'intró. D'aquesta manera, si la reacció es duu a terme sobre DNA genòmic de llevat, es detectarà un fragment de més grandària que si es realitza fent servir com a motlle cDNA, obtingut a partir d'RNA total.

En aquesta pràctica es pretén utilitzar l'estratègia esmentada per a confirmar la presència de l'intró descrit.

PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

3.1. AMPLIFICACIÓ MITJANÇANT PCR DE LA REGIÓ DEL GEN *ACT1* QUE INCLOU L'INTRÓ

1) Cada parella durà a terme dues reaccions de PCR, fent servir com a motlle en una DNA genòmic i en l'altra cDNA. Com a encebadors s'han d'utilitzar dos oligonucleòtids situats a ambdós costats de l'intró.

ACT1-1	GGATCTTCTACTACATCAGC (82 nt en 5' respecte de l'ATG)
ACT1-2	CACATACCAGAACCGTTATC (41 nt en 3' respecte del final de l'intró)

Les PCR es realitzen a partir de la mescla de reacció següent:

DNA genòmic/cDNA	5 µL
dNTPs 2,5 mM	1,6 µL
Tp 10X *	2 µL
Oligo ACT1-1	2 µL
Oligo ACT1-2	2 µL
DNA-polimerasa Taq (diluïda 10 vegades)	3 µL
Aigua	4,4 µL

*Tot depenent de la Taq polimerasa disponible en el moment de fer la pràctica, podria ser necessari introduir MgCl₂ en la mescla de reacció,

i utilitzant el programa del termociclador:

Un cicle de 94°C x 3 min
30 cicles de: 94°C x 1 min, 45°C x 1 min, 72°C x 1 min
Un cicle de 72°C x 10 min
4°C

Una vegada acabada la reacció de PCR, s'hi afegirà 4 µL de solvent de mostres 6X i es guardaran les mostres a 4°C.

3.2. ANÀLISI ELECTROFORÈTICA DELS PRODUCTES DE PCR

Per a això cal preparar un gel d'agarosa 1,8% (p/v) seguint el mateix procediment descrit en la pràctica 2 (apartat 2.3).

- 1) S'injecten 15 µL de la reacció de PCR amb una pipeta automàtica de 20 µL. Un dels pouets centrals s'usa per a posar 5 µL del patró de grandàries *FastRuler DNA ladder*.
- 2) L'electroforesi es desenvolupa a 100 V durant una hora.
- 3) Es fotografia el gel en un transil·luminador de llum ultraviolada.

MATERIAL, PRODUCTES I DISSOLUCIONS

Material biològic

DNA genòmic i cDNA de la soca de llevat FY86 (*Mat^a, his3-200, leu2-1, ura3-52*)

Material

Termociclador per a PCR

Puntes estèrils

Tubs per a PCR

Pipetes automàtiques de 2 i 20 µL

Productes i dissolucions

H₂O estèril

Oligonucleòtids

Taq DNA polimerasa

Tampó per a PCR

dNTPs, 2,5 mM en cadascun d'ells

Solvent de mostres 6X (pràctica 2)

Agarosa

Bromur d'etidi 10 mg/mL en H₂O

Patró de pesos moleculars *FastRuler DNA ladder* (grandàries de 50, 200, 400, 850 i 1.500 pb)

PRÀCTICA 4. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS GAL EN EL LLEVAT *Saccharomyces cerevisiae*

Els gens *GAL* de llevat constitueixen un model molt interessant per a entendre la regulació de l'expressió gènica en eucariotes, ja que s'indueixen per galactosa i, a més, estan reprimits per glucosa. Aquests gens codifiquen la permeasa Gal2p i enzims que catalitzen la conversió de galactosa en glucosa-1-fosfat per a la seua entrada en la ruta glicolítica (Gal1p, Gal7p i Gal10p). Hi ha, a més, altres gens *GAL* reguladors, com Gal4p (activador), Gal80p (inhibidor) i Gal3p (mediador de la resposta).

En la inducció per galactosa estan implicades les proteïnes Gal4p i Gal80p. La presència de galactosa condueix a l'activació del factor transcripcional Gal4p, una proteïna amb dits de Zn que reconeix un element UAS en el promotor d'alguns dels gens *GAL*. En absència de galactosa Gal4p està inhibït per la seua interacció amb Gal80p, mentre que en presència d'aquest sucre Gal4p resta lliure per a activar els gens *GAL*.

La repressió per glucosa d'aquests gens, com la de molts altres, està controlada per Mig1p, una altra proteïna amb dits de Zn, que reprimeix l'expressió dels gens regulats mitjançant aquest mecanisme a través del reclutament d'un complex repressor que inclou Tup1p. En condicions de limitació de glucosa, la quinasa Snf1p inactiva Mig1p, i evita així la seua interacció amb Tup1p.

En aquesta pràctica estudiarem l'expressió del gen *GAL1* de *S. cerevisiae* en diferents condicions de cultiu, així com l'efecte de mutacions en funcions reguladores de l'expressió del gen. Per a fer això s'ha d'utilitzar una fusió *GAL1-lacZ* que s'ha integrat en el genoma del llevat o és present en un plasmidi.

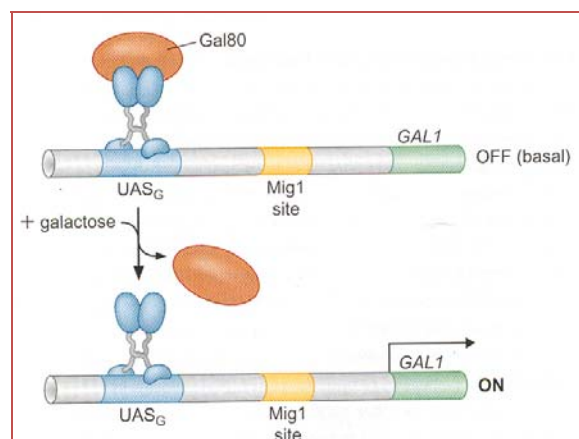


Figura procedent de Watson i col. (2004)

PROTOCOL EXPERIMENTAL

4.1. INOCULACIÓ DE LES SOQUES

- 1) Cada grup de pràctiques disposa de medi YPD per a fer créixer la soca mutant i de medi SC-ura per a la soca salvatge (2 tubs amb 3 mL de YPD o SC-ura i 2 matrassos de 100 mL amb 50 mL de YPD o SC-ura). També disposa de 2 matrassos de 100 mL amb 12 mL de YPGal.
- 2) Cada grup de pràctiques inocular la soca salvatge i la mutant als tubs de YPD o SC-ura. S'incuben a 30°C durant la nit.

4.2. CONTROL DELS CULTIUS

Es mesura la DO_{600} dels precultius i s'inocula 5 μ L de precultiu (soca crescuda en SC-ura) o 10 μ L de precultiu (soca crescuda en YPD) en 50 ml de medi YPD o SC-ura (als matrassos de 100 mL) i es continua la incubació fins al dia següent. (Nota: les quantitats concretes que cal inocular depenen de la densitat òptica; els suggeriments que s'han indicat corresponen a valors al voltant de 10).

4.3. PRESA DE MOSTRES EN MEDIS AMB DIFERENT FONT DE CARBONI

- 1) Es mesura la DO₆₀₀ amb 1 mL del cultiu. Se separa el volum de cultiu que correspon a una quantitat de cèl·lules equivalent a 10 DO₆₀₀. S'arreglen les cèl·lules per centrifugació, es renten amb 1 mL d'azida sòdica i es guarden congelades. **Aquestes seran les mostres en 2% de glucosa.**
- 2) De la resta del cultiu, se separa una alíquota de 10 mL, es transfereix a un tub Corning estèril de 15 mL i es recullen les cèl·lules per centrifugació (2.500 rpm, 3 minuts). Les cèl·lules es renten amb 2 mL de medi YPGal i es resuspenen en aquest medi amb el volum inicial (10 mL).
- 3) Les cèl·lules es transfereixen a matrassos estèrils i s'incuben a 30°C amb agitació durant 2 hores.
- 4) Una vegada transcorregut aquest temps, es mesura i anota la DO₆₀₀ de cada cultiu. S'arreglen les cèl·lules corresponents a 10 DO₆₀₀ per centrifugació, es renten amb azida sòdica i es congelen a -20°C. **Aquestes seran les mostres en galactosa.**

4.4. MESURA DE L'ACTIVITAT β-GALACTOSIDASA

- 1) Les cèl·lules es resuspenen en 1 mL de tampó Z i es passen a un tub d'hemòlisi.
- 2) Es permeabilitzen afegint 20 µL de cloroform i 30 µL de SDS 0,1% i agitant al Vortex durant 10 segons a la màxima velocitat.
- 3) S'hi afegeix 200 µL d'ONPG (O-nitrofenil-β-D-galactopiranosid, a 4 mg/mL en tampó Z acabat de preparar).
- 4) Es deixa desenvolupar el color i s'anota el temps transcorregut (mínim de 7 min i màxim de 30 min).
- 5) La reacció s'atura mitjançant l'addició de 500 µL de CO₃Na₂ 1M.
- 6) Es transfereix a un Eppendorf d'1,5 mL i se centrifuga a 10.000 rpm, 5 min, per a eliminar residus de les cèl·lules.
- 7) Es mesura la DO a 420 nm.
- 8) Per a calcular les unitats d'activitat β-galactosidasa, es fa servir la fórmula següent:

$$DO_{420} \times 1000 / v \text{ (mL del cultiu)} \times t \text{ (min)} \times DO_{600} \text{ del cultiu}$$

MATERIAL, PRODUCTES I SOLUCIONS

Material biològic

Las soques del llevat *Saccharomyces cerevisiae* que es fan servir en aquesta pràctica són les següents:

- BY4742 /*GAL1-lacZ*: soca salvatge (*MATa*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *lys2Δ0*, *ura3Δ0*) transformada amb un plasmidi episomal amb marcador *URA3* que conté la fusió *GAL1-lacZ*)
- GGY::171: *MATa*, *leu2-3*, *112his3-Δ200*, *ura3-52*, *ade2*, *Δgal4*, *Δgal80*, *URA3::GAL1-lacZ* (integrada)

Material

- 2 tubs d'assaig amb tapa microbiològica per parella
- 4 matrassos de 100 mL per parella
- Agitador orbital de tubs
- Agitador de matrassos en cambra de 30°C
- Colorímetre
- Cubetes de colorímetre
- Puntes de pipeta estèrils
- Pipetes automàtiques de 20, 200 i 1.000 µL
- Tubs Corning de 15 mL
- Tubs d'hemòlisi
- Agitador de tubs (Vortex)
- Tubs Eppendorf d'1,5 mL

Centrífuga de taula
Centrífuga Biofuge
Recipients per a gel

Productes i dissolucions

Medi YPD: extracte de llevat 0,5% (p/v), peptona 2% (p/v) i glucosa 2% (p/v)
(es necessita 1 L per grup de pràctiques)

Medi YPGal: com l'anterior, però amb 2% de galactosa en lloc de glucosa
(es necessiten 300 mL per grup de pràctiques)

Medi SC-ura: mescla d'aminoàcids (*drop out*) sense uracil 0,2% (p/v), base nitrogenada per a llevat sense aminoàcids i sense sulfat amònic 0,17% (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5% (p/v), glucosa 2% (p/v)
(es necessiten 500 mL per grup de pràctiques)

Azida 10 mM (es necessiten 100 mL per grup de pràctiques)

Tampó Z (conté en 1 L d'aigua): 16,1 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pH 7,0; 5,5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,6 g de KCl, 0,246 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,7 mL de β -mercaptoetanol
(es necessiten 100 mL per grup de pràctiques)

Cloroform (es necessiten 2 mL per grup de pràctiques)

SDS 0,1% (p/v) (es necessiten 2 mL per grup de pràctiques)

ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactopiranosid)

CO_3Na_2 1 M (es necessiten 30 mL per grup de pràctiques)

Sulfat amònic

OBJECTIUS DE LES PRÀCTIQUES

ACTIVITATS QUE CAL DESENVOLUPAR

Pràctica 1. Analitzar com la presència de lactosa, IPTG i glucosa + lactosa afecta l'activitat β -galactosidasa en *Escherichia coli*.

S'ha de fer un histograma per a representar-hi els resultats, que mostre la variació de l'activitat enzimàtica respecte del temps per a cadascun dels tractaments considerats.

Pràctica 2. Determinar el valor de la grandària nucleosomal en l'eritròcit de pollastre.

Per tal de fer-ho cal obtenir prèviament la grandària de cadascuna de les bandes detectables en l'electroforesi (mitjançant la representació gràfica escaient) i, a continuació, fer-ne els càlculs corresponents.

Pràctica 3. Comprovar que el gen *ACT1* del llevat *Saccharomyces cerevisiae* conté un intró.

Cal deduir la grandària de tots els fragments que s'haurien d'obtenir mitjançant PCR a partir del DNA genòmic i del cDNA (consulteu la informació facilitada en el quadern de laboratori) i determinar si coincideixen amb els obtinguts experimentalment.

Pràctica 4. Determinar com la presència de glucosa/galactosa en el medi de cultiu afecta l'expressió del gen *GAL1* de *S. cerevisiae*, així com la funció que tenen en la seua regulació els gens *GAL 4* i *GAL 80*.

Per a obtenir conclusions sobre aquests dos aspectes, una vegada determinada l'activitat β -galactosidasa en les diferents mostres, s'ha de construir un histograma en què s'aprecien les variacions d'activitat en cada soca segons la font de carboni disponible.

BIBLIOGRAFIA

HASHIMOTO, H. *et al.* (1983) “Regulation of expression of the galactose gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and characterization of the regulatory gene *GAL4*”. *Mol. Gen. Genet.* **191**: 31-38

LEWIN B. (2000). *Gens VII*. Oxford University Press.

LUQUE, J.; HERRÁEZ, A. (2001). *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud*. Ediciones Harcourt S.A.

PÉREZ-ORTÍN J. E. *et al.* (1988). “Analysis of chromatin structure and composition”. *Biochem. Edu.* **16**: 45-48.

TORCHIA, T. E. *et al.* (1984) “Disruption of regulatory gene *Gal80* in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on carbon-controlled regulation of the galactose/melibiose pathway genes”. *Mol. Cell Biol.* **4**: 1521-1527

WATSON, J. D. *et al.* (2008). *Molecular Biology of the Gene*, 6a edición. Pearson International Education.

ZHANG, X.; BRENER, H. (1995) “Control of the *Escherichia coli* *rmB* P1 promoter strength by ppGpp”. *J. Biol. Chem.* **12**: 1181-1184