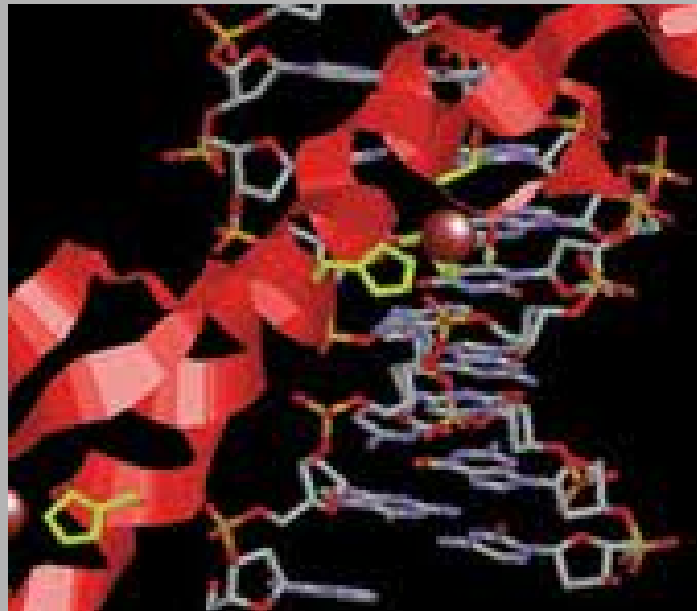




UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I
BIOLOGIA MOLECULAR**



**MANUAL DE PRÀCTIQUES DE MÈTODES EN
BIOLOGIA MOLECULAR I ENGINYERIA GENÈTICA**

TERCER CURS

GRAU DE BIOTECNOLOGIA

PRÀCTIQUES DE MÈTODES EN BIOLOGIA MOLECULAR I ENGINYERIA GENÈTICA

Índex de les pràctiques

Pràctica 1. Construcció d'una genoteca.

Pràctica 2. Expressió de proteïnes en *Escherichia coli*.

Pràctica 3. Construcció del mapa de restricció d'un
plasmidi.

Pràctica 4. Obtenció de sondes d'alguns gens del llevat
mitjançant PCR.

PRÀCTIQUES DE MÈTODES EN BIOLOGIA MOLECULAR I ENGINYERIA GENÈTICA

Curs 2011-2012

CALENDARI ORIENTATIU

DIA 1 (dilluns) 4 hores

- Digestió del vector i del DNA passatger amb enzims de restricció (pràct. 1.1, núm. 1-2)
- Preparació de medis (pràct. 1.2, núm 1-3; pràct. 2.1, núm. 1-3)
- Anàlisi de la digestió per electroforesi (pràct. 1.1, núm. 3-7)
- Lligament del DNA (pràct. 1.1, núm. 8-13)
- Inoculació dels cultius d'*Escherichia coli* per a la purificació de la proteïna de fusió amb GST (pràct. 2.2, núm. 1)

DIA 2 (dimarts) 4 hores

- Dilució del cultiu, creixement, inducció amb IPTG (2 h) i recollida de cèl·lules (pràct. 2.2, núm. 2-7)
- Restricció del plasmidi YIp5 (pràct. 3.1, núm. 1-4)
- Transformació d'*E. coli* (pràct. 1.2, núm. 4-8)
- Preparació d'un gel d'agarosa (pràct. 3.2, núm. 1)

DIA 3 (dimecres) 4 hores

- Preparació d'extractes, purificació de la proteïna i preparació del gel de poliacrilamida (pràct. 2.2, núm. 8-11, 2.3 i 2.4)
- Electroforesi de les mostres del mapa de restricció (pràct. 3.2, núm. 2-4)
- Anàlisi mitjançant PCR de diferents gens del llevat (pràct. 4.1 i 4.2)
- Preparació de dos gels d'agarosa (pràct. 1.4, núm. 1; pràct. 4.3, núm. 1)
- Sembra de colònies transformants (pràct. 1.3, núm. 1)

DIA 4 (dijous) 2 hores

- Aïllament dels plasmidis de la genoteca (pràct. 1.3, núm. 2-10)
- Realització de l'electroforesi en gel de poliacrilamida (pràct. 2.5, núm. 1-5)
- Electroforesi de les mostres de les PCR (pràct. 4.3, núm. 2-3)
- Restricció de les mostres de la genoteca (pràct. 1.3, núm. 11-13)

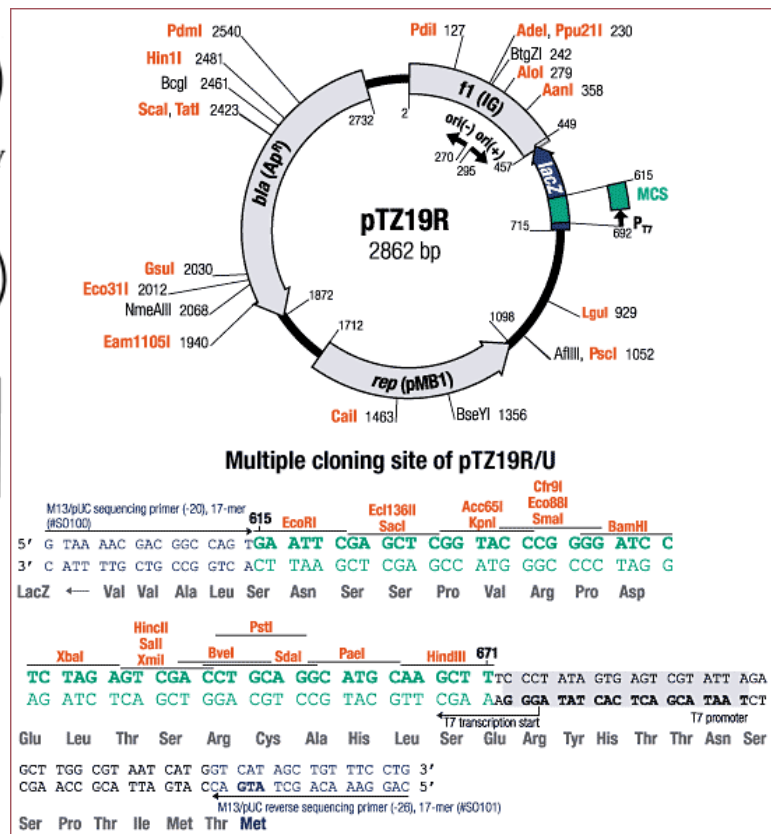
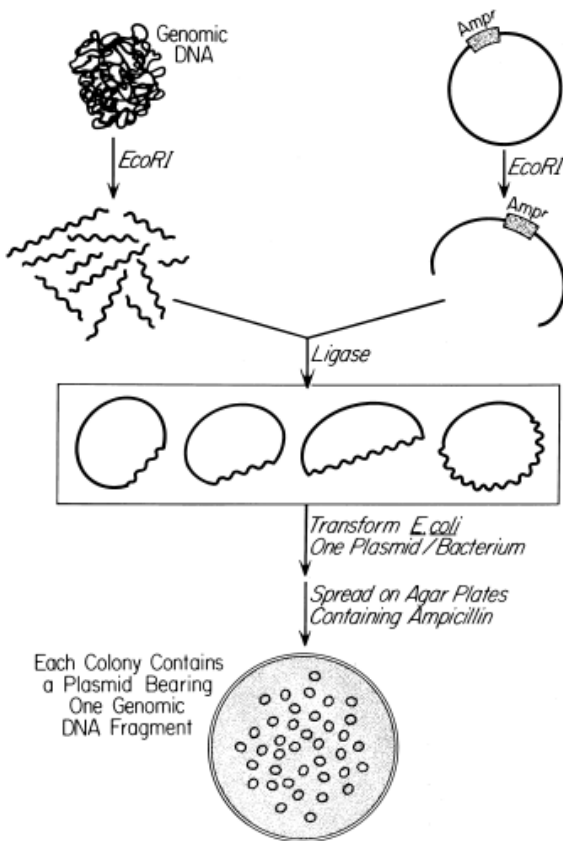
DIA 5 (divendres) 2 hores

- Electroforesi de les mostres de la genoteca (pràct. 1.4, núm. 2-4)
- Anàlisi dels resultats de l'electroforesi en PAGE (pràct. 2.5, núm. 6)
- Discussió general dels resultats

PRÀCTICA 1: CONSTRUCCIÓ I ANÀLISI D'UNA GENOTECA

Una genoteca permet disposar pràcticament de tot el genoma d'un organisme distribuït en fragments entre nombroses molècules de vector. La construcció i utilització de genoteques ha esdevingut una part més dels experiments de mutagènesi i permet la identificació de gens capaços de complementar determinades mutacions. Aquesta eina és, doncs, fonamental per tal d'avançar en el coneixement de la funció dels gens d'un organisme.

Hi ha diverses estratègies per a la construcció de genoteques. En aquesta pràctica utilitzem una aproximació a aquesta metodologia, que consisteix en la introducció de fragments del genoma del llevat (13×10^6 pb) en el plasmidi pTZ19R. Encara que aquesta no siga la manera més convencional de preparar una genoteca, permet desenvolupar el procés complet, utilitzar tècniques diverses d'usos múltiples en biologia molecular i fer càlculs fonamentals per a comprovar la bondat d'una genoteca, com ara la grandària mitjana de l'insert i la probabilitat que un clon de la genoteca tinga una seqüència determinada del genoma en l'insert.



Esquema del procediment que cal seguir per a la construcció de la genoteca i el mapa del plasmidi utilitzat. Figures procedents de <http://www.gene-quantification.de/mrna.html> i <http://www.fermentas.com/en/products/all/molecular-cloning/sd014>, respectivament.

OBJECTIU: Construcció d'una genoteca del llevat en el plasmidi Bluescript i anàlisi (càlcul de la grandària de la genoteca, de la grandària mitjana de l'insert i de la representativitat de la genoteca per al genoma del llevat)

PROTOCOL EXPERIMENTAL

1.1. CONSTRUCCIÓ DE LA GENOTECA

(Aquest protocol l'ha de fer individualment cada grup.)

- 1) Es digereix tant el plasmidi vector (pTZ19R) com el DNA genòmic del llevat en dos tubs Eppendorf d'1,5 mL diferents, tot seguint l'esquema següent:

	pTZ19R	DNA genòmic del llevat
DNA	5 µL (0,25 µg)	5 µL (12 µg)
<i>Eco</i> RI	2 µL	2 µL
<i>Hind</i> III	2 µL	2 µL
Tampó B 10X	5 µL	5 µL
H ₂ O	36 µL	36 µL

- 2) S'incuba 60 min a 37°C.
- 3) Es prepara un gel d'agarosa de 100 mL al 0,8% (p/v) en TBE 0,5X (un gel per a tots els grups).
Encara que ja s'han preparat gels d'aquest tipus en altres pràctiques, cal recordar que s'ha de pesar la quantitat d'agarosa escaient, afegir-hi el tampó, fondre l'agarosa en microones i, quan la solució estiga refredada a uns 40-50°C, afegir-hi 2 µl de BrEt i vessar-la en una placa-suport, en la qual s'ha col·locat la pinta prèviament.
- 4) Una vegada transcorregut el temps previst per a fer les restriccions, s'agafa una alíquota de 6 µL de cadascun dels tubs i es mescla amb 1,5 µL de solvent de mostres per a electroforesi.
- 5) S'apliquen les mostres als pouets del gel i s'hi inclouen també com a patrons quantitats equivalents de pTZ19R i de DNA genòmic del llevat no digerits, així com 3 µL de λ/*Hind*III.
- 6) Es desenvolupa l'electroforesi a 100 V durant 30-60 min.
- 7) S'observa el resultat en un transil·luminador UV (302 nm) amb una protecció adequada per a la irradiació.
- 8) Mentre es desenvolupa l'electroforesi, es precipita el DNA de la resta de les mostres digerides. Per tal de fer-ho, s'afegeix a cadascuna 82 µL d'aigua, 10 µL d'acetat sòdic 3 M, 1 µL de glicogen i 220 µL d'etanol fred. Els tubs es mantenen 30 min a -20°C.
- 9) Es recull el precipitat per centrifugació a 13.000 rpm durant 10 min.
- 10) Es renten els precipitats amb 500 µL d'etanol 70% i se centrifuguen a 13.000 rpm 5 min.
- 11) S'assequen els precipitats i es dissolen, cadascun, en 4 µL de H₂O estèril.
- 12) Es prepara una reacció de lligament amb els components següents:
- 4 µL de vector digerit
 - 4 µL de DNA del llevat digerit
 - 1 µL de tampó ligasa 10X
 - 1 µL de ligasa
- 13) La mescla s'incuba a 16°C durant la nit.

1.2. TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS

(Aquest protocol s'ha de realitzar en conjunt fins al punt 3 i, després, l'ha de continuar individualment cada grup.)

1) Es preparen 350 mL de medi LB. S'omplin 24 tubs amb 3 mL/tub de LB i s'hi afegeix 4,2 g d'agar a la resta del medi. Vuit dels tubs es marquen com a "LB" i els altres com a "LBA".

2) S'esterilitzen aquests medis a l'autoclau.

3) Quan el medi amb agar ja esterilitzat està a uns 40°C, s'hi afegeix 275 µL d'ampicil·lina 25 mg/mL, Xgal 20 mg/mL i IPTG 100 mM. A continuació, es vessa en plaques Petri (uns 25 mL per placa). Cada grup necessitarà una d'aquestes plaques.

Als tubs marcats com LBA s'afegeixen 3 µL d'ampicil·lina i es guarden a 4°C.

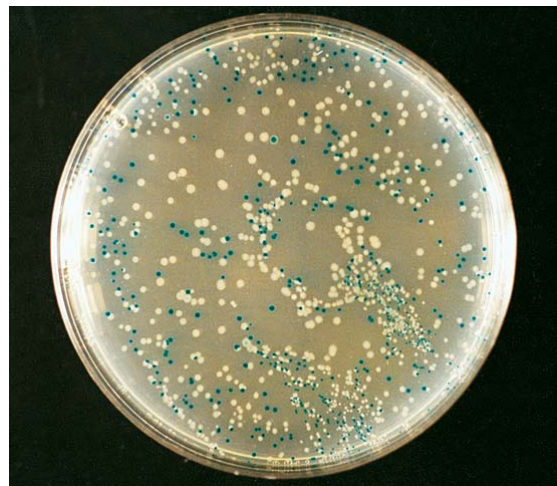
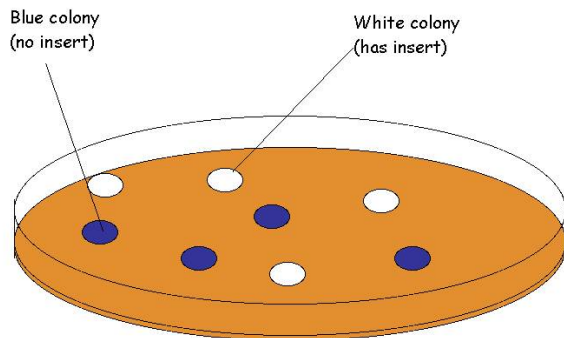
4) Al dia següent es trau del congelador de -80°C un tub amb cèl·lules competents (100 µL) per a cada parella. Després de descongelar-se en gel, els tubs es deixen 10 minuts més a 0°C i s'hi afegeix la mescla de lligament. S'incuba 30 minuts a 0°C.

5) Les cèl·lules se sotmeten a un xoc tèrmic durant 2 minuts a 42°C.

6) Després se'ls afegeix 1 mL de LB líquid d'algun dels tubs "LB", es transfereix el contingut a un tub Corning de 15 mL i s'incuba a 37°C durant una hora.

7) Tot seguit les cèl·lules es transfereixen a un tub Eppendorf, que se centrifuga a 12.000 rpm durant 1 min. El sediment es resuspèn en 150 µL d'aigua destil·lada estèril i s'estén a les plaques corresponents de LBA + X-Gal + IPTG.

8) Aquestes plaques es deixen durant 5-10 minuts a temperatura ambient i, a continuació, s'inverteixen i s'incuben a 37°C fins al dia següent.



Resultat previsible de la transformació. Figures procedents de:

<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB211/InsertInactnotes.html>,

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=B3928|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC, respectivament.

1.3. AÏLLAMENT I RESTRICCIÓ DELS PLASMIDIS RECOMBINANTS

(Aquest protocol l'ha de dur a terme cada grup individualment, tret de la preparació d'algunes dissolucions.)

- 1) Cada grup inocula 3-5 colònies blanques dels transformants obtinguts als dos tubs de LBA preparats el primer dia de pràctiques. S'incuben a 37°C amb agitació durant la nit.
- 2) Es recullen per centrifugació (5.000 rpm, 3 min) les cèl·lules corresponents a 1,5 mL de cadascun dels tubs sembrats en Eppendorfs. Cal eliminar el sobrenadant.
- 3) Les cèl·lules es resuspenen completament en 100 µL de solució GTE. Els vials s'incuben en gel durant 5 min.
- 4) A continuació s'afegeix a cada vial 200 µL d'una solució de NaOH-SDS preparada prèviament. Es mescla per inversió del tub diverses vegades. S'incuben els tubs en gel durant 5 min.
- 5) S'hi afegeixen 150 µl de solució d'acetat potàssic, s'inverteix també el tub diverses vegades i s'incuba en gel 5 min.
- 6) El sediment format se separa centrifugant a 12.000 rpm, 5 min. Es transfereixen 450 µl del sobrenadant de cada tub (mitjançant una pipeta automàtica i anant amb compte de no resuspendre el sediment) a un nou vial d'1,5 mL.
- 7) El DNA plasmídic es precipita amb 900 µL d'etanol a -20°C durant 30 min.
- 8) El precipitat es recull per centrifugació a 13.000 rpm, 10 min.
- 9) Se separa el sobrenadant amb una pipeta, s'afegeix 500 µL d'etanol 70% al sediment i se centrifuga a 13.000 rpm, 5 min.
- 10) S'assequen els precipitats i es dissolen en 25 µl de tampó TE.
- 11) Per a l'anàlisi de restricció, s'agafa una alíquota de 5 µL i es digereix amb 1 µL d'*EcoRI* i 1 µL de *HindIII*, en presència d'1,5 µL del tampó B de restricció 10X, 1,5 µL de RNasa 1 µg/µL i 5 µL de H₂O estèril.
- 12) S'incuba 60 min, a 37°C.
- 13) S'hi afegeix 3 µL de solvent 6X a cadascuna de les mostres i aquestes es guarden a 4°C fins al dia següent.

1.4. PREPARACIÓ DE LES PLAQUES D'AGAROSA PER A LES ELECTROFORESIS DE LES RESTRICCIONS DELS PLASMIDIS DE LA GENOTECA

(Aquest protocol l'han de realitzar tots els grups conjuntament.)

- 1) Es prepara un gel d'agarosa 1,2% de 100 mL pel procediment descrit en l'apartat 1.1.3.
- 2) S'aplica tot el volum de cada mostra a la placa d'electroforesi. S'hi inclouen patrons de vector sense digerir, així com de p100, p1000 i λ /HindIII.
- 3) L'electroforesi es desenvolupa a 100 V fins que el blau de bromofenol arriba a l'extrem del gel.
- 4) Es fotografia cada gel i s'analitzen els resultats.

MATERIAL, PRODUCTES I DISSOLUCIONS

Material biològic:

Cèl·lules competents de la soca d'*Escherichia coli* DH5 α
Plasmidi pTZ19R
DNA genòmic del llevat

Material:

Tubs d'assaig amb tapa microbiològica
Anses de platí
Anses Digralsky
Agitador orbital de tubs
Agitador de tubs de sobretaula (Vortex)
Estufa i bany de 37°C
Font de buit
Agitador magnètic
Microones
Bany de gel
Font d'electroforesi
Cubeta d'electroforesi
Pipetes automàtiques de 20, 200 i 1000 μ l
Transil·luminador de llum ultraviolada
Tubs Eppendorf d'1,5 mL
Plaques Petri
Puntes de pipetes automàtiques

Productes i dissolucions:

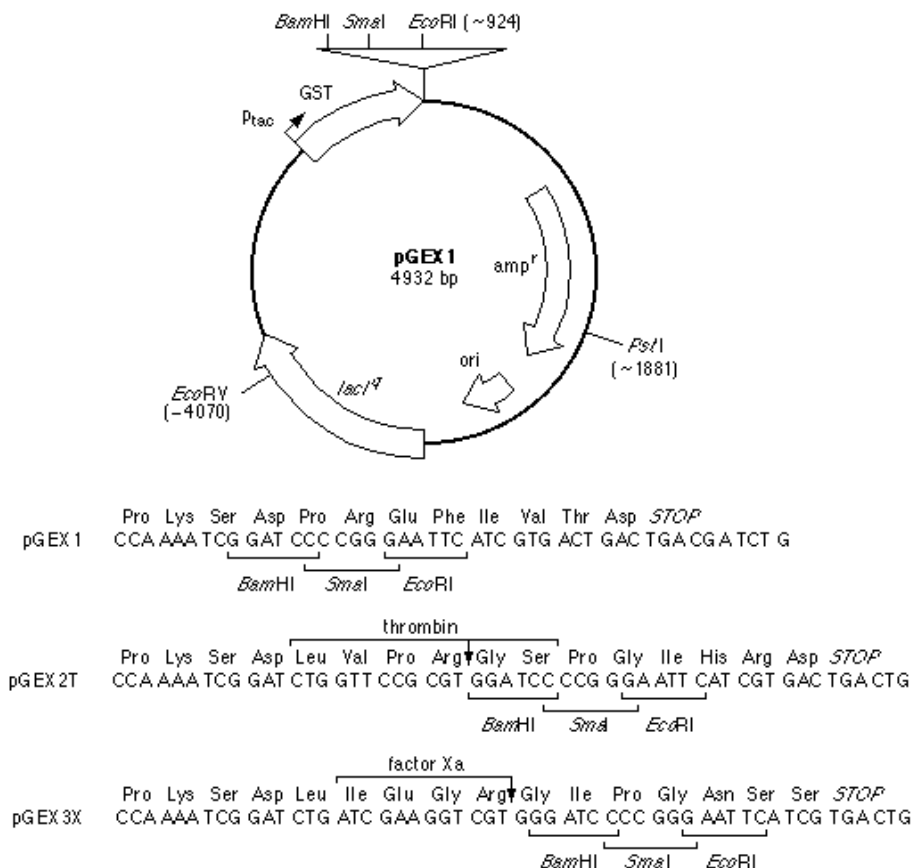
- Medi de cultiu LB: Tryptona 1% (p/v)
 Extracte de llevat 0,5% (p/v)
 NaCl 1% (p/v)
- Dissolució d'ampicil·lina: ampicil·lina sòdica 25 mg/ml (1 mL per grup de pràctiques)

PRÀCTICA 2: EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES EN *Escherichia coli*

L'expressió de proteïnes en *E. coli* és una tècnica de gran utilitat quan hom pretén aconseguir quantitats importants d'una proteïna el gen codificant de la qual ha estat clonat prèviament. D'aquesta manera és possible obtenir anticossos contra la proteïna o plantejar-se estudis estructurals, de caracterització d'activitats enzimàtiques, o d'interaccions amb altres proteïnes, per esmentar-ne només alguns exemples.

Per tal de facilitar la purificació de la proteïna expressada, durant els darrers anys s'han dissenyat estratègies, basades en la utilització de diferents tipus de vectors, que permeten disposar d'una proteïna de fusió formada per la proteïna d'interès i un polipèptid, o una altra proteïna que puga purificar-se fàcilment mitjançant cromatografia d'afinitat.

En aquesta pràctica es planteja la utilització d'un sistema en què la proteïna que cal purificar queda unida per manipulació genètica amb la GST (glutatió S-transferasa). Per a aconseguir aquesta fusió es poden fer servir vectors com els que es mostren en la figura inferior. En aquests vectors el gen d'interès s'introdueix utilitzant el lloc múltiple de clonació situat darrere de la regió codificant de GST. És necessari, per descomptat, assegurar en la construcció el manteniment de la pauta de lectura entre GST i la proteïna corresponent. El repressor lac (producte del gen *lacI*) s'uneix al promotor *ptac* i, per tant, es reprimeix l'expressió de la proteïna de fusió amb GST en condicions normals. Quan s'afegeix IPTG al medi de creixement dels bacteris, es desreprimeix l'expressió del gen i s'expressa la proteïna de fusió. Alguns dels vectors disponibles (pGEX 2T i pGEX 3X) inclouen també en la regió de clonació llocs de tall de proteases (com ara la trombina o el factor Xa respectivament); això permet, una vegada aconseguida la purificació de la proteïna de fusió, separar la proteïna d'interès del component GST.



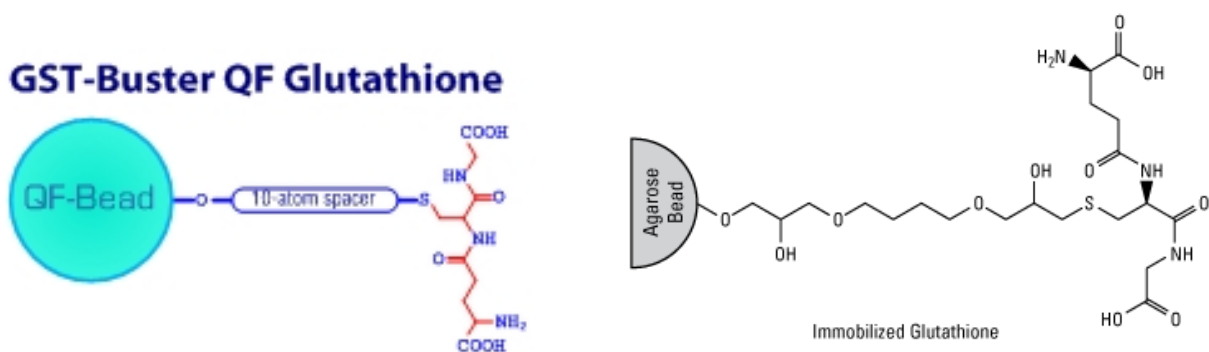
Mapa d'alguns plasmidis de la sèrie pGEX (<http://www.currentprotocols.com/protocol/mb1607>)

La purificació de la proteïna de fusió es duu a terme mitjançant cromatografia d'afinitat fent servir com a matriu *Sepharose 4B* o *Agarose*. El glutatió s'uneix a aquesta matriu mitjançant acoblament amb el

grup oxirà de la matriu epoxi activa, com pot observar-se en la figura. La complementaritat entre l'estructura del glutatió unit al gel i el seu centre d'unió en la GST permet que la proteïna de fusió romanga retinguda en la columna que conté *Glutathione Sepharose-4B* quan es passa a través d'aquesta un extracte proteic de cèl·lules bacterianes on es troba la proteïna que cal purificar. L'elució posterior d'aquesta s'aconsegueix mitjançant l'addició de glutatió 5 mM.



Glutatió-Sheparose 4B (http://www.canspecsci.com/pdshowtwo/productshow_9185742.html) i esquema de la unió a aquesta matriu de proteïnes de fusió amb GST (http://www.bio-world.com/productinfo/2_18_843/126475/OnePass-GST-Tagged-Recombinant-Protein-Purification.html)



Unió del glutatió a *Sepharose 4B* (esquerra) o *Agarose* (dreta). Figures procedents de: <http://edit2.amocol.com/pages08/Products.php> i <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=FC02B0E4-5056-8A76-4E1D-9CC175CEE6CC>

En aquesta pràctica es farà la purificació mitjançant fusió amb GST de la proteïna Ufd1p del llevat *Saccharomyces cerevisiae*, de 40 kDa, implicada en el transport de proteïnes des del reticle endoplasmàtic fins al citosol per a la seua degradació pel proteasoma.

OBJECTIU: Comprovació de la purificació d'una proteïna de fusió amb GST

PROTOCOL EXPERIMENTAL

2.1. PREPARACIÓ DE MEDIS DE CULTIU

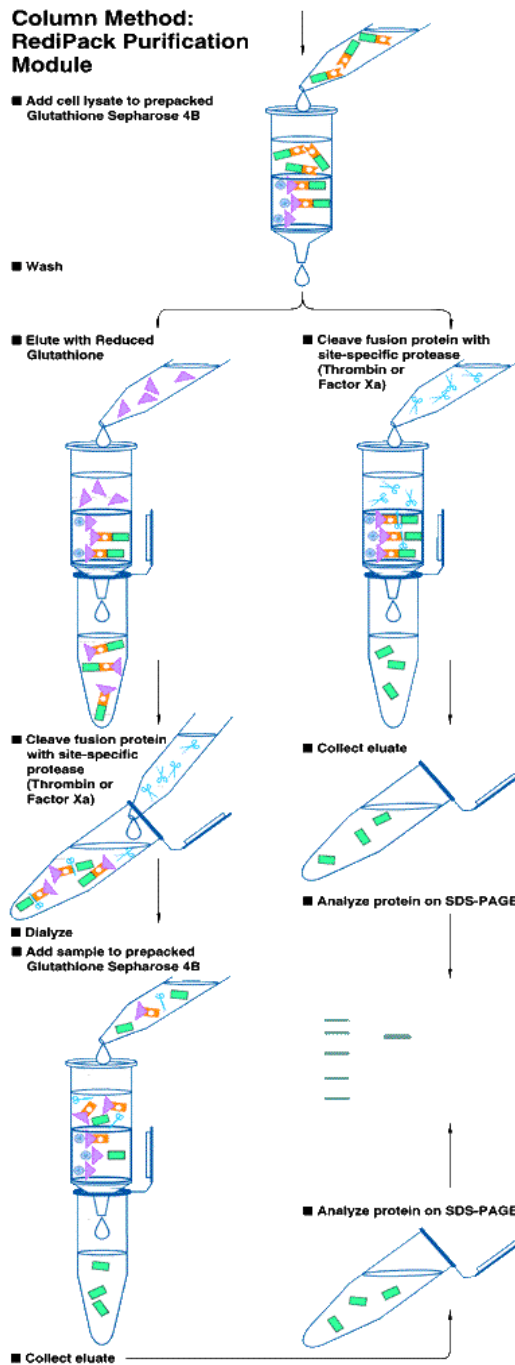
- 1) Es prepara conjuntament per a tots els grups 200 mL de medi LB. Es distribueix en 8 tubs Corning de 15 mL (amb 2 mL de medi en cadascun) i matrassos de 100 mL (amb 20 mL en cadascun).
- 2) S'esterilitzen els medis.
- 3) Quan els medis autoclavats s'han refredat suficientment, s'hi afegeix ampicil·lina a cada tub (2 μ L) i matràs (20 μ L).

2.2. CREIXEMENT DELS BACTERIS I PREPARACIÓ D'EXTRACTES

- 1) S'inoculen els tubs que contenen 3 mL de medi LBA amb la soca XL1-Blue transformada amb el plasmidi que conté la fusió gènica d'interès. S'incuben durant la nit a 37°C amb agitació.
- 2) Al dia següent, es transfereix tot el contingut dels precultius als matrassos amb 20 mL de LBA.
- 3) S'incuben els matrassos a 37°C durant 90 minuts.
- 4) A continuació, s'agafa una mostra d'1 mL (C), que servirà com a control (s'hi detectaran les proteïnes de la soca abans d'induir l'expressió de la proteïna de fusió). Se'n recullen les cèl·lules per centrifugació a 6.000 rpm durant 5 min, es decanta el sobrenadant, es resuspèn el precipitat en 1 mL d'aigua destil·lada estèril, se centrifuga novament en les mateixes condicions, es resuspèn el sediment en 40 μ L d'aigua i se li afegeix 40 μ L de solvent de mostres 2X. Tot seguit, s'incuba 5 min a 95°C i es guarda a 4°C.
- 5) S'afegeix IPTG 100 mM (105 μ L) a la resta del cultiu, fins que arribi a una concentració final de 0,5 mM.
- 6) S'incuba durant 2 hores a 37°C.
- 7) Les cèl·lules del cultiu es recullen aleshores per centrifugació a 6.000 rpm durant 10 min. Se separa el sobrenadant i les cèl·lules es guarden congelades a -20°C.
- 8) Es descongelen les cèl·lules i es resuspenen en 1 mL de tampó PBS.
- 9) Es trenquen per sonicació durant 3 min.
- 10) Se centrifuga la solució de cèl·lules lisades a 13.000 rpm durant 10 min.
- 11) Es transfereix el sobrenadant a un nou tub per a purificar la proteïna de fusió. D'aquest sobrenadant, se'n separen 10 μ L, es mesclen amb un volum de solvent de mostres 2X i s'incuben a 95°C durant 5 min. Aquesta mostra (L) ens indicarà el contingut total de proteïnes en el lisat obtingut després de la inducció amb IPTG.

2.3. PURIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA DE FUSIÓ

La figura següent mostra el procediment complet de purificació, encara que en aquesta pràctica es durà a terme el procés esquematitzat en la part de l'esquerra i sense efectuar les darreres etapes (tall i diàlisi). Tampoc no s'hi faran servir columnes.



Esquema del procés de purificació d'una proteïna de fusió amb GST. Figura procedent de:
<http://www.escience.ws/b572/L12/L12.htm>.

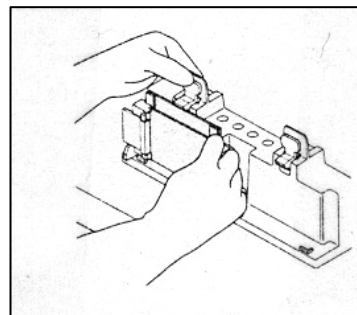
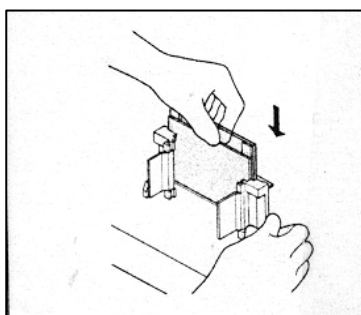
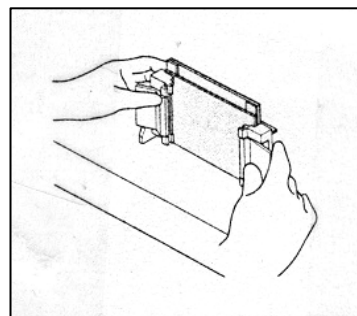
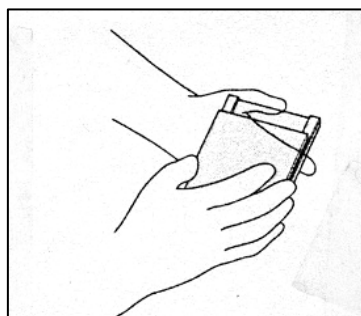
- 1) Es mescla el sobrenadant procedent de la centrifugació anterior amb 200 μL de *Glutathione S-Sepharose*.
- 2) S'incuba 10 min amb agitació a temperatura ambient.
- 3) Es recull la resina per centrifugació a 7.000 rpm durant 1 min.
- 4) La resina es renta 3 vegades (resuspensió i centrifugació en les mateixes condicions) amb 1 mL de tampó PBS.
- 5) S'elueix la proteïna de fusió, per a la qual cosa s'hi afegeix 150 μL de glutatió reduït 5 mM, s'incuba 2 min amb agitació i se centrifuga a 10.000 rpm 1 min.
- 6) S'hi addiciona al sobrenadant de la centrifugació (P) 37,5 μL de solvent de mostres 5X, s'escalfa a 95°C durant 5 min i es guarda a 4°C juntament amb les mostres del dia anterior.

2.4. PREPARACIÓ DE GELS DE POLIACRILAMIDA

S'han de preparar dos gels per a tot el laboratori.

1) Muntatge de la carcassa i polimerització de l'acrilamida

- Es netegen a fons amb etanol les plaques de vidre i la pinta de plàstic, i s'assequen.
- Es col·loca la placa curta damunt i, en un extrem de la placa amb espaiadors, intentem ajustar-la d'una sola vegada per tal d'evitar moviments addicionals.
- Es fan lliscar les dues plaques dins del marc de polimerització amb la placa curta cap a fora. Cal assegurar-se que les dues plaques arriben exactament al nivell inferior del marc.
- Es bloquegen amb les abraçadores de pressió per a segellar les dues plaques de vidre.
- Se situa el marc sobre el suport i s'encaixa amb la pinça, tot assegurant-nos que les plaques de vidre pressionen sobre la goma del fons del suport.



- Com que l'electroforesi és discontinua, es polimeritzen 2 gels: l'inferior, amb un 8% d'acrilamida, i el superior, amb 4% d'acrilamida. Els gels es preparen seguint la taula següent.

Gel inferior: 8% acrilamida		Gel superior: 4% acrilamida	
Dissolució A	2,81 mL	Dissolució A	1 mL
Dissolució B	5,63 mL	Dissolució BX	3,75 mL
Aigua	2,78 mL	Aigua	2,7 mL
Persulfat amònic 10% (C)	112,5 µL	Persulfat amònic 10%	75 µL
TEMED	7,5 µL	TEMED	10 µL

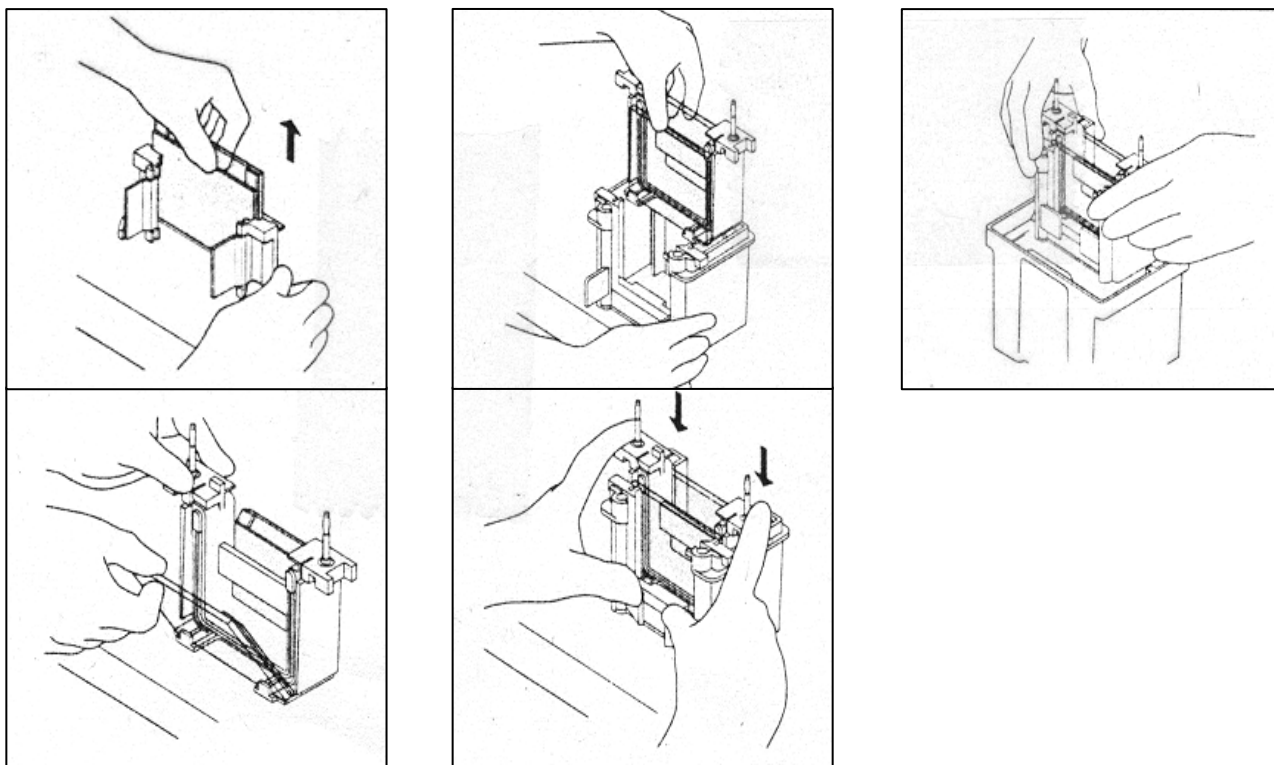
Nota: Les dissolucions A, B, BX i C es proporcionen. En primer lloc, es prepara la dissolució del 10% i només quan aquesta haja gelificat entre les plaques, es prepara la del 4%. No s'han de confondre les dissolucions B i BX, ja que difereixen en concentració i pH, i cadascuna ha d'utilitzar-se exclusivament per al gel corresponent.

- Es vessa la mescla corresponent al gel inferior (10% d'acrilamida) entre les plaques de vidre fins que ocupa aproximadament 5 cm des de l'extrem inferior. Es cobreix posteriorment amb aigua, amb l'ajuda d'una pipeta, tot evitant la formació de bombolles i la distorsió de la línia superficial. I es deixa gelificar (30-45 min aproximadament).

- S'elimina l'aigua per decantació i es renta diverses vegades amb aigua. Es vessa la dissolució corresponent al gel superior (4% d'acrilamida, vegeu-ne la taula adjunta) i es col·loca la pinta amb la precaució de no formar bombolles d'aire entre la pinta i el gel. Les dents de la pinta han de quedar a una distància aproximada de 0,5 cm de la part superior del gel inferior. Cal continuar vessant fins que la dissolució arribi a l'extrem superior de la placa a través dels canals formats entre les dents de la pinta. I es deixa gelificar almenys durant una hora (es pot deixar tota la nit).

2) Preparació de la placa per a l'electroforesi

- Es trauen les plaques del suport de gelificació. Es lleva la pinta amb cura de no trencar els pouets. Aquests es dibuixen amb un retolador i es numeren.
- Es col·loca la placa amb el gel en el suport d'electroforesi, amb el vidre curt cap a l'interior, i es col·loca el conjunt dins de la cubeta d'electroforesi.
- S'afegeix el tampó d'electroforesi als recipients exterior i interior, tot procurant que el tampó estiga en contacte amb el gel i que no queden bombolles entre ambdós.



2.5. ANÀLISI DE LA PURIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA MITJANÇANT ELECTROFORESI

- 1) Cada grup injecta 15 μ L de cadascuna de les mostres C, L i P en el gel de poliacrilamida-SDS preparat el dia anterior. S'aplica en un altre pouet 10 μ L del patró de grandàries.
- 2) Es connecta el pol positiu (roig) de la font de corrent continu al born inferior de la cubeta i el negatiu al born superior. Se selecciona un amperatge constant de 40 mA.
- 3) Es desconnecta la font quan el marcador (blau de bromofenol) es trobe a menys d'1 cm de l'extrem inferior del gel (aproximadament 1,5 hores).
- 4) Es trau el gel situat entre les plaques de vidre i se submergeix en la dissolució colorant durant almenys mitja hora.
- 5) Es destiny el gel durant tota la nit i es transfereix a aigua destil·lada al matí següent.
- 6) S'observa el gel en un transil·luminador i s'interpreten els resultats.

MATERIAL, PRODUCTES I SOLUCIONS

Material biològic:

Soca XL1-blue transformada amb el plasmidi que conté la fusió GST-UFD1.

Material:

Tubs Eppendorf d'1,5 mL
Pipetes automàtiques de 20, 200 i 1000 µL
Puntes de pipeta estèrils
Tubs de cultiu
Matrassos de 100 mL
Cornings de 50 mL
Etiquetes adhesives
Recipients per a gel
Centrífuga Biofuge
Transil·luminador de llum visible
Agitador de tubs (Vortex)
Plaques de vidre d'electroforesi
Cubeta d'electroforesi
Font d'electroforesi
Pinta d'electroforesi
Safates de tinció de gels

Productes i dissolucions:

- Medi LBA (vegeu la Pràctica 1)
- Patró de grandàries per a electroforesi de proteïnes (*PageRuler Prestained Protein Ladder*), mescla de proteïnes de 10, 17, 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130 i 170 kDa.
- Ampicil·lina 25 mg/mL (es necessiten 500 µL per grup de pràctiques)
- IPTG 100 mM (1 mL per grup de pràctiques)
- PBS (1 L d'1X per a totes les pràctiques):
 - NaCl 0,137 M
 - KCl 2,7 mM
 - Na₂HPO₄ 100 mM
 - KH₂PO₄ 2 mM
- Glutatió reduït 5 mM (3 mL per grup de pràctiques)
- Glutatió agarosa
- Tampó d'electroforesi (1 L):
 - Tris 0,025 M
 - glicina 0,192 M
 - SDS 0,10 %
- Colorant per a la tinció de gels (200 mL per grup). Blau de Coomassie R-250 al 0,1% en àcid acètic 8% i metanol 40%
- Decolorant de gels (1 L):
 - 5% àcid acètic
 - 20% metanol
- SDS 2X, 3X i 5X (1 mL):
 - El 3X conté:
 - SDS 6,5%
 - mercaptoetanol 2 M
 - glicerol 25%
 - blau de bromofenol 0,02%
 - Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8

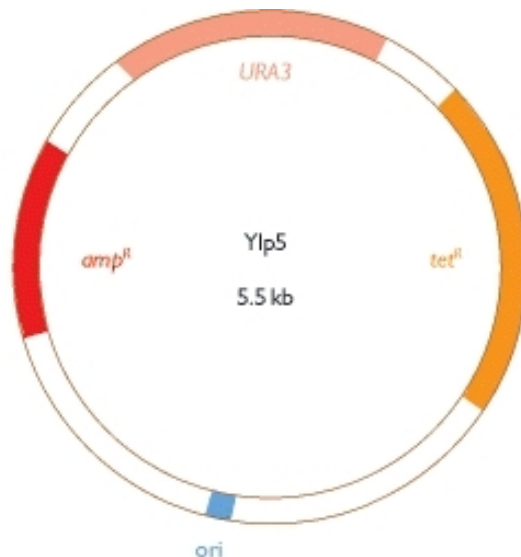
- Dissolució A (50 mL):
Acilamida 30% (p/v)
Bisacilamida 0,8% (p/v)
- Dissolució B (50 mL): (tampó gel inferior)
Tris-HCl 1,5 pH 8,8
SDS 0,4%
- Dissolució BX (50 mL): (tampó gel superior)
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8
SDS 0,4 %
- Dissolució C: persulfat amònic 10% (p/v)

PRÀCTICA 3: MAPA DE RESTRICCIÓ DEL PLASMIDI YIp5

Els plasmidis són molècules de DNA circular amb capacitat de replicació autònoma que es poden trobar en bacteris, llevats... Constitueixen instruments importantíssims en biologia molecular per la seua possibilitat de ser manipulats mitjançant la introducció de seqüències exògenes de DNA, i també perquè es poden introduir en les cèl·lules fent servir tècniques de transformació.

Pel que fa a l'ús en biologia molecular, va ser fonamental el descobriment, cap als anys 70, dels enzims de restricció. Aquests enzims s'aïllen a partir de bacteris, on representen un dels mecanismes de defensa enfront de DNA exògens. Es caracteritzen pel reconeixement de seqüències específiques en el DNA (de 4 a 8 pb normalment) i per la seua capacitat de tallar dins o fora d'aquestes seqüències (segons el tipus d'enzim de restricció de què es tracte).

En aquesta pràctica utilitzarem el plasmidi YIp5 (*yeast integrating plasmid 5*), de 5.541 pb, un plasmidi integratiu (figura inferior) que confereix resistència a l'ampicil·lina (Ap) i tetraciclina (Tc), conté *oriC* i inclou el gen marcador *URA3*. Digerirem el plasmidi amb 3 enzims de restricció de manera independent o combinada, amb la finalitat de poder construir allò que anomenem *mapa de restricció del plasmidi*, és a dir, de poder situar les posicions relatives de reconeixement i tall per a aquests enzims sobre un cercle que represente el plasmidi. Les nucleases de restricció que farem servir corresponen al grup conegut com tipus II, de manera que tallen dins de les seues seqüències de reconeixement. Es tracta dels enzims *EcoRI*, *PstI* i *SalI*.



Mapa simplificat del plasmidi Yip5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21129/>)

OBJECTIU: Construcció del mapa de restricció del plasmidi YIp5 amb els enzims de restricció *EcoRI*, *PstI* i *SalI*.

PROTOCOL EXPERIMENTAL

3.1. DIGESTIÓ DEL PLASMIDI AMB ELS ENZIMS DE RESTRICCIÓ I PREPARACIÓ DE LES MOSTRES PER A L'ELECTROFORESI EN AGAROSA

Aquest protocol el duu a terme cada grup, segons l'esquema següent:

Grup	<i>EcoRI</i>	<i>Sall</i>	<i>PstI</i>	<i>EcoRI/Sall</i>	<i>EcoRI/PstI</i>	<i>Sall/PstI</i>	<i>EcoRI/Sall/PstI</i>
A	X (A1)	X (A2)					
B	X (B1)	X (B2)					
C			X (C1)	X (C2)			
D			X (D1)	X (D2)			
E					X (E1)	X (E2)	
F					X (F1)	X (F2)	
G							X (G1)
H							X (H1)

- 1) En un vial d'1,5 mL es mesclen els components de la reacció de restricció:
 - 3 µL del plasmidi (5 µL en el cas de les restriccions triples).
 - 1 µL de cada enzim.
 - 1,5 µL del tampó H de restricció 10X.
 - Aigua destil·lada estèril fins a completar 15 µL.
 En aquesta mescla els enzims de restricció són els últims components que s'han d'afegir.
- 2) Després d'agitar els vials, aquests s'incuben a 37°C durant 90 minuts.
- 3) Quan s'ha completat la digestió, s'afegeix a cada Eppendorf 3 µL de solvent de mostres 6X per a electroforesi de DNA.
- 4) Les mostres es guarden a la nevera fins al moment d'aplicar-les en el gel d'electroforesi.

3.2. PREPARACIÓ DE LA PLACA D'AGAROSA AL 0,8%. APLICACIÓ DE LES MOSTRES (Tots els grups han de realitzar aquest protocol conjuntament)

- 1) Es prepara un gel d'agarosa de 100 mL segons hem descrit en la pràctica 1.
- 2) S'aplica la totalitat de cadascuna de les mostres amb una pipeta automàtica, d'acord amb l'esquema següent:

YIp5	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	Patró 100 bp	Patró 1 kpb	E1	E2	F1	F2	G1	G2	YIp5
------	----	----	----	----	----	----	----	----	-----------------	----------------	----	----	----	----	----	----	------

Els pouets centrals es fan servir per a posar dos patrons de grandàries, un que consisteix en múltiples de 100 pb (*P100*) i l'altre que conté com a bandes de menor grandària les de 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500 i 3.000 pb (*1 kb ladder*). Els dos pouets dels extrems es deixen lliures.

- 3) L'electroforesi es desenvolupa a 100 V fins que el blau de bromofenol arriba a 1 cm del final del gel.
- 4) Es fotografia el gel.

MATERIAL, PRODUCTES I SOLUCIONS

Material biològic:

Plasmidi YIp5

Enzims de restricció: *EcoRI*, *PstI* i *SalI*

Material:

Tubs Eppendorf d'1,5 mL

Pipetes automàtiques de 20, 200 i 1.000 µL

Puntes de pipeta estèrils

Matràs de 250 mL

Provetes de 100 mL i 1 L

Imant

Etiquetes adhesives

Cinta adhesiva

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

Transil·luminador de llum ultraviolada

Agitador de tubs (Vortex)

Productes i dissolucions:

Tampó de digestió B 10X

Agarosa

Solvent de mostres (6X):

Glicerol 30%

TBE 6X

Blau de bromofenol 0,25% (p/v)

Blau de xilencianol 0,25% (p/v)

Patrons de grandàries P100 i P1000

Tampó TBE:

Tris 89 mM

Àcid bòric 89 mM

EDTA 1 mM, pH 8,3

Bromur d'etidi 10 mg/mL en H₂O

PRÀCTICA 4. AMPLIFICACIÓ DE SONDES ESPECÍFIQUES D'ALGUNS GENS DEL LLEVAT MITJANÇANT PCR

El desenvolupament de la tècnica de la reacció en cadena per la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) ha estat fonamental en l'evolució de la biologia molecular. Es tracta d'una tècnica que permet amplificar fragments específics del DNA i el seu impacte ha transcendit la biologia molecular mateixa, ja que té múltiples aplicacions en medicina i criminologia (proves de paternitat, estudis forenses...).

Aquesta tècnica es basa en l'ús d'una polimerasa termoestable, la DNA polimerasa Taq, que s'aïlla de bacteris procedents d'ambients amb temperatures elevades i que presenta una temperatura òptima al voltant dels 70°C, sense inactivar-se durant breus incubacions a 95°C. Això permet amplificar el DNA mitjançant l'ús d'uns aparells, coneguts com a *termocicladors*, en els quals es duen a terme cicles controlats i repetits d'incubació a 95°C, 40-55°C i 72°C. Les diferents temperatures utilitzades en cada cicle permeten, respectivament, que el DNA es desnaturalitzi, que els encebadors necessaris per a la còpia del DNA puguin emparellar amb les seues regions complementàries en el DNA motlle d'interès i que la polimerasa copie el DNA. La repetició d'aquests cicles entre 20 i 40 vegades permet amplificar selectivament la regió del DNA delimitada pels encebadors seleccionats.

En aquesta pràctica aplicarem aquesta tècnica per a l'amplificació de fragments específics corresponents a alguns gens del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Es tracta dels gens *ARG1*, *MET3*, *MIS1* i *YLL055W*. D'aquesta manera podríem disposar de sondes per a poder dur a terme hibridacions sobre filtres que contingueren DNA genòmic o RNA aïllat de soques crescudes en determinades situacions.

OBJECTIU: Amplificació de fragments específics d'alguns gens del llevat mitjançant PCR

PROTOCOL EXPERIMENTAL

4.1. OBTENCIÓ DE DNA CRU DEL LLEVAT

(Tot el protocol l'ha de realitzar individualment cada grup.)

- 1) S'agafa una colònia d'una placa de la soca del llevat BY4742 amb una punta groga autoclavada i es resuspèn en un tub Eppendorf d'1,5 mL que conté 15 µL de NaOH 20 mM.
- 2) S'incuba el tub durant 15 minuts a temperatura ambient.
- 3) L'extracte cru dels llevats es fa servir directament com a solució de DNA per a les reaccions de PCR.

4.2. REACCIONS DE PCR

- 1) Es preparen les reaccions en tubs de PCR d'acord amb l'esquema següent:

- 2 µL de solució de DNA del llevat
- 5 µL de tampó de PCR 10X*
- 4 µL de dNTP 2,5 mM
- 2 µL d'oligo a
- 2 µL d'oligo b
- 31 µL de H₂O

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

Cada grup utilitza una parella d'encebadors diferent:

Grups A i B: ARG1a i ARG1b
Grups C i D: MET3a i MET3b
Grups E i F: MIS1a i MIS1b
Grups G i H: YLL055Wa i YLL055Wb

Finalment, s'hi afegeixen 4 µL de polimerasa Taq diluïda 10 vegades i es mescla el contingut amb l'ajuda d'una pipeta automàtica.

2) La reacció es desenvolupa en un termociclador utilitzant el programa següent:

- 94°C, 3 min
- 30 cicles formats per:
 - 94°C, 1 min
 - 45°C, 1 min 30 s
 - 72°C, 2 min
- 72°C, 10 min
- 4°C fins a la sessió següent.

4.3. ANÀLISI DELS PRODUCTES DE PCR

- 1) Es prepara un gel d'agarosa al 0,8% de 100 mL que continga bromur d'etidi (protocol 1.1.3).
- 2) Es mesclen 5 µL de cadascuna de les mostres amb 1 µL de solvent de mostres 6X.
- 3) S'apliquen les mostres en l'electroforesi. Per tal de poder determinar la grandària dels fragments s'inclou en un altre pouet 3 µL de patró *1 kb ladder*.

MATERIAL, PRODUCTES I DISSOLUCIONS

Material biològic

Soca del llevat BY4742

Oligonucleòtids específics dels gens analitzats:

ARG1a:	GGGAAAAGTTTGTGGCTT
ARG1b:	CTTCACCTTTGGTTTTTTGG
MET3a:	TGCCTGCTCCTCACGGTGG
MET3b:	AGTTCTTACCTGGGCCCGC
MIS1a:	TATTGAGTAACTCGAGGG
MIS1b:	ATCTGTGGAACCCATCAA
YLL055Wa:	AGAAATCACGCCTGAACA
YLL055Wb:	GCAACTGATACCAATGTC

Material

Termociclador per a PCR

Centrífuga

Puntes grogues estèrils

Eppendorfs d'1,5 mL estèrils

Tubs per a PCR

Pipetes automàtiques de 2, 20 i 200 µL

Productes i dissolucions

- H₂O estèril
- Tampó TBE: Tris 89 mM
 Àcid bòric 89 mM
 EDTA 1 mM, pH 8,3
- Taq DNA polimerasa
- Tampó PCR 10X i MgCl₂ (si cal)
- Solvent de mostres 6X (pràctica 1)
- Agarosa
- Bromur d'etidi 10 mg/mL en H₂O
- Patró de pesos moleculars *1 kb ladder*

ANÀLISI DELS RESULTATS EXPERIMENTALS OBTINGUTS EN LES PRÀCTIQUES

Pràctica 1: Preparació d'una genoteca de DNA genòmic del llevat

a) Càlcul de la grandària de la genoteca

- 1) Quantes colònies totals has obtingut?
- 2) Quin percentatge de clons tenen insert?
- 3) Quants clons totals té la teua *minigenoteca*?

b) Càlcul de la grandària mitjana de l'insert

- 4) Quina és la grandària mitjana dels inserts de les genoteques del teu grup de pràctiques? (Representa en paper mil·limetrat el càlcul de les grandàries dels *inserts*).

c) Càlcul de la representativitat de la genoteca per al genoma del llevat

- 5) Quants *equivalents de genoma* té la teua genoteca?
- 6) Quina és la probabilitat de trobar qualsevol seqüència en la teua genoteca?

Pràctica 2: Comprovació de la purificació d'una proteïna de fusió amb GST

- 7) Calcula la grandària de la proteïna purificada, tenint en compte que GST té 26 kDa. (Representa en paper mil·limetrat el càlcul de la grandària)

Pràctica 3: Determinació del mapa de restricció del plasmidi YIp5 amb els enzims *Eco RI*, *Pst I* i *Sal I*

- 8) Calcula mitjançant una representació en paper mil·limetrat les grandàries de tots els fragments de restricció.
- 9) Dibuixa sobre un cercle el mapa de restricció del plasmidi.

Pràctica 4: Amplificació de gens del llevat mitjançant PCR

- 10) Estima les grandàries de totes les bandes de PCR.
- 11) Comprova que les grandàries observades coincideixen amb el que es pot esperar a partir de la seqüència dels gens i la dels oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació del fragment de cada gen. Pots trobar la seqüència dels gens en:

<http://www.yeastgenome.org/>

BIBLIOGRAFIA

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

LUQUE, J.; HERRÁEZ, A. (2001). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Harcourt.

PRIMROSE, S. B. i TWYMAN, R. M. (2006). *Principles of gene manipulation and genomics*. 7a ed. Blackwell Publishing.

PÉREZ-ORTÍN, J. E.; DEL OLMO, M.; MATALLANA, E.; TORDERA, V. (1997). “Making your own gene library”. *Biochem. Edu.* 25: 237-242.

WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. (1992). *Recombinant DNA*. 2a ed. Scientific American Books.